



**Radiotracer für die molekulare Bildgebung des Zellzyklus:  
Radiomarkierung von Inhibitoren der Cdk4/6 mit den Radionukliden  
Iod-124 und Fluor-18**

**D I S S E R T A T I O N**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Lena Köhler (geb. Vogler)  
geboren am 01. Dezember 1982 in Erfurt

Eingereicht am: 18. Januar 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Radiopharmazie des Forschungszentrums Dresden-Rossendorf in der Zeit von September 2006 bis Dezember 2009 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Jörg Steinbach angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. J. Steinbach

Prof. Dr. F. Wüst

Tag der Verteidigung: 11. Mai 2010

*„La terre nous en apprend plus long sur nous que tous les livres.*

*Parce quelle nous résiste. L'homme se découvre quand il se mesure avec l'obstacle.“*

Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Grundlagen des Zellzyklus.....	2
1.2 Cyklin-abhängige Kinasen – die Schlüsselenzyme der Zellzyklusregulation .....	3
1.2.1 Die G <sub>1</sub> -Cdk/Cyk-Komplexe.....	5
1.2.2 Der S-Phasen Cdk/Cyk-Komplex .....	6
1.2.3 Die mitotischen Cdk/Cyk-Komplexe .....	6
1.3 Inhibitoren der cyklinabhängigen Kinasen (Ckis) .....	7
1.3.1 Natürliche Inhibitoren der cyklinabhängigen Kinasen .....	7
1.3.2 Synthetische Ckis erster Generation .....	8
1.4 Cyklin-abhängige Kinasen als Targets zur Tumordiagnostik/-therapie.....	10
1.5 Das Radiotracerprinzip und die Grundlagen der Positronen-Emissions-Tomographie .....	18
1.6 Die Positronen-emittierenden Radionuklide <sup>18</sup> F und <sup>124</sup> I.....	21
1.6.1 Radiofluorierung.....	23
1.6.2 Radioiodierung.....	26
<b>2. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>29</b>
<b>3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>31</b>
3.1 Syntheseplanung.....	31
3.2 Synthese der Markierungsvorstufen und deren Referenzen .....	34
3.2.1 Synthese der Pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-Grundgerüste.....	36
3.2.2 Synthese der Seitenketten .....	49
3.2.3 Anbindung der Seitenketten an die Grundgerüste.....	54
3.2.4 Synthese der Referenzsubstanzen <b>CKIA</b> und <b>CKIB</b> und deren Markierungsvorstufen.....	57
3.2.5 Synthese der Referenzsubstanzen <b>CKIC</b> und <b>CKID</b> .....	61
3.2.6 Synthese der Referenzsubstanz <b>CKIE</b> und der Markierungsvorstufe <b>24</b> ....	62
3.2.7 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung der Referenzsubstanzen mittels FACS.....	64
3.3 Untersuchungen zur radioaktiven Markierung.....	67
3.3.1 Vorbetrachtungen .....	67
3.3.2 Darstellung von [ <sup>124</sup> I] <b>CKIA</b> .....	70
3.3.3 Darstellung von [ <sup>124</sup> I] <b>CKIB</b> .....	78
3.3.4 Untersuchungen zur Darstellung <sup>18</sup> F-tragender Markierungsbausteine .....	79
3.3.4.1. Direkte Markierung in einer Ein-Schritt-Synthese.....	80
3.3.4.2. Indirekte Markierung in einer Zwei-Schritt-Synthese .....	81
3.3.5 Darstellung von [ <sup>18</sup> F] <b>CKIE</b> .....	90
3.3.6 Bestimmung der spezifischen Aktivität .....	97
3.3.7 Bewertung der Radiosynthesen .....	99

3.4	Radiopharmakologische Charakterisierung der <sup>124</sup> I- und <sup>18</sup> F- markierten Cdk Inhibitoren.....	102
3.4.1	Bestimmung der Lipophilie.....	102
3.4.2	Bestimmung der <i>in vitro</i> - und <i>ex vivo</i> -Stabilität.....	104
3.4.3	Bestimmung der <i>in vitro</i> -Zellaufnahme an HT-29 und FaDu Zelllinien.....	105
3.4.4	Bestimmung der <i>in vivo</i> -Stabilität in Wistar-Ratten.....	109
3.4.5	Untersuchung zur Bioverteilung in Wistar-Ratten.....	111
3.4.6	Bewertung der Verbindungen [ <sup>124</sup> I]CKIA, [ <sup>124</sup> I]CKIB und [ <sup>18</sup> F]CKIE als Radiotracer .....	113
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>116</b>
<b>5.</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>121</b>
<b>6.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>122</b>
6.1	Material.....	122
6.1.1	Geräte.....	122
6.1.2	Chemikalien .....	123
6.1.3	Radionuklide .....	124
6.1.4	Zelllinien .....	125
6.2	Methoden .....	125
6.2.1	Festphasenextraktion.....	125
6.2.3	Dünnschichtchromatographie.....	126
6.2.4	Schmelzpunktbestimmung .....	127
6.2.5	NMR-Spektroskopie.....	127
6.2.6	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	128
6.2.7	Flash-Chromatographie .....	129
6.2.8	Bestimmung der spezifischen Aktivität .....	129
6.2.9	Bestimmung der Lipophilie.....	130
6.2.10	Stabilitätsstudien.....	130
6.2.11	Bioverteilungsuntersuchungen .....	131
6.2.12	Zellaufnahmestudien.....	131
6.2.13	Zellzyklusanalyse.....	132
6.3	Organische Synthesen .....	132
6.3.1	Synthese von <i>tert</i> -Butyl-4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-carboxylat ( <b>1</b> ) .....	132
6.3.2	Synthese von 1-(6-Nitropyridin-3-yl)piperazin ( <b>2</b> ) .....	133
6.3.3	Synthese von <i>tert</i> -Butyl-4-(6-nitropyridin-3-yl)piperazine-1-carboxylat ( <b>3</b> ) .....	134
6.3.4	Synthese von 1-(4-Nitrophenyl)piperazin ( <b>4</b> ) .....	135
6.3.5	Fluorierung der Seitenkette .....	135
6.3.6	Reduktion der Seitenketten .....	136
6.3.7	Synthese von 4-Cyclopentylamin-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-carbonsäure-ethylester ( <b>11</b> ) .....	138
6.3.8	Synthese von 4-Cyclopentylamin-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl methanol ( <b>12</b> ).....	139
6.3.9	Synthese von 4-Cyclopentylamino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl carbaldehyd ( <b>13</b> ) .....	139
6.3.10	Synthese von 1-(4-Cyclopentylamino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl)-ethanol ( <b>14</b> ).....	140
6.3.11	Synthese von 1-(4-Cyclopentylamino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl)-ethanon ( <b>15</b> ) .....	141

6.3.12	Synthese von 8-Cyclopentyl-5-methyl-2-methylsulfanyl-8H-pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7-on ( <b>16</b> ) .....	141
6.3.13	Synthese von 8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-methylsulfanyl-8H-pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7-on ( <b>17</b> ) .....	142
6.3.14	Synthese von 6-Acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-methylsulfanyl-8H-pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-7-on ( <b>18</b> ) .....	143
6.3.15	Oxidation zum Sulfoxid mit dem Oxaziridin <b>27</b> .....	144
6.3.16	Kupplung von Grundgerüst und Seitenkette .....	145
6.3.17	Entschützung .....	148
6.3.18	Einführung der Trimethylstannylabgangsgruppe .....	150
6.3.19	Fluorethylierung .....	152
6.3.20	Synthese von 2-Phenylsulfonyl-3-phenyl-oxaziridin ( <b>27</b> ) .....	154
6.3.21	Synthese von 1-Brom-2-toluolsulfonylethan ( <b>28</b> ) .....	155
6.4	Radiochemische Methoden .....	156
6.4.1	Synthese von [ <sup>124</sup> I] <b>29</b> .....	156
6.4.2	Synthese von [ <sup>124</sup> I] <b>CKIA</b> .....	157
6.4.3	Synthese von [ <sup>124</sup> I] <b>30</b> .....	158
6.4.4	Synthese von [ <sup>124</sup> I] <b>CKIB</b> .....	159
6.4.5	Trocknung [ <sup>18</sup> F]Fluorid für manuelle Synthesen .....	159
6.4.6	Manuelle Synthese von 1-Brom-2-[ <sup>18</sup> F]Fluorethan ([ <sup>18</sup> F] <b>BFE</b> ) .....	160
6.4.7	Automatisierte Synthese von 1-Brom-2-[ <sup>18</sup> F]Fluorethan ([ <sup>18</sup> F] <b>BFE</b> ) im Synthesemodul .....	160
6.4.8	Manuelle Synthese von 1-[ <sup>18</sup> F]Fluorethyl-2-tosylat ([ <sup>18</sup> F] <b>FETos</b> ) .....	162
6.4.9	Automatisierte Synthese von 1-[ <sup>18</sup> F]Fluorethyl-2-tosylat ([ <sup>18</sup> F] <b>FETos</b> ) .....	162
6.4.10	Synthese von [ <sup>18</sup> F] <b>CKIE</b> .....	163
7.	LITERATURVERWEISE .....	165
8.	ANHANG .....	177
A	Verwendete Abkürzungen .....	177
B	Optimierung der Fluorethylierung .....	179
C	Abbildungsverzeichniss .....	180
D	Tabellenverzeichniss .....	183
	DANKSAGUNG .....	184
	PUBLIKATIONEN .....	185
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	187



### 1. Einleitung

Im Jahr 2004 erkrankten nach Angaben des Robert-Koch-Instituts in der Bundesrepublik zirka 436.500 Menschen neu an Krebs [1]. 2007 starben über 217.000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung [2]. Auf Grund der relativ geringen Überlebensraten ist Krebs hinter den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache und die Anzahl der Neuerkrankungen nimmt stetig zu [1]. Die demographische Entwicklung Deutschlands führt zu der Vermutung, dass die Zahl der Krebserkrankungen weiter steigen wird. Frühzeitige Diagnosen und Therapiemöglichkeiten sind daher dringend erforderlich.

Die Entartung von Gewebe kann beispielsweise auf genetische Prädispositionen zurückgeführt und/oder durch exogene Einflüsse ausgelöst werden. So kann es zu einer Vielzahl von Mutationen in einer Zelle kommen, wodurch diese die Eigenkontrolle über ihre Differenzierung und Teilung im Zellzyklus sowie der Apoptose verliert und einen Wachstumsvorteil gegenüber den umliegenden Zellen erhält [3].

Cyklinabhängige Proteinkinasen (Cdk) spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. Viele Tumore, wie z.B. malignes Sarkom, Gliom und Mammakarzinom zeigen eine deregulierte Cdk4-Aktivität und/oder -Expression. Insgesamt zeigen ca. 80% aller Tumore eine Fehlregulation der für den Zellzyklus zentralen Cdk4/CykD1/INK4/pRb/E2F Signalkaskade [4-7]. Somit besitzen Cdk4 ein enormes therapeutisches Potential im Kampf gegen Krebs. Die spezifische Inhibierung der Cdk4 verhindert die Zellproliferation und damit das Tumorstadium. In den letzten Jahren wurden verschiedenste Strukturklassen vorgestellt, die als Cdk4-Inhibitoren wirken. Vor allem die von VanderWel *et al.* und Toogood *et al.* vorgestellten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine zeigen sehr gute Selektivitäten [8-13]. Eine der Verbindungen, PD 0332991, wird zurzeit in klinischen Studien der Phase I und II untersucht, zum einen als einmal tägliche orale Verabreichung an Patienten mit soliden Tumoren, zum anderen in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason bei Patienten mit multiplen Myelom [10]. Unter Einwirkung des Inhibitors konnte sogar der Rückgang von Tumoren in humanen Xenograft-Mausmodellen beobachtet werden [10].

Die Synthese und Untersuchung von radiomarkierten Inhibitoren der Cdk4/6 als Mittel zur Charakterisierung von Tumoren *in vivo* ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.



Die Entscheidung, ob sich eine Zelle teilt, ist je nach Zelltyp von der Präsenz verschiedener mitogener und antimitogener Faktoren (u.a. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Zelladhäsion, Zell-Zell-Kontakt) abhängig. Wenn einer Zelle in der G<sub>1</sub>-Phase die mitogenen Reize, wie z.B. Wachstumsfaktoren, fehlen oder wenn ein Zell-Zell-Kontakt erfolgt, gehen die Zellen in die G<sub>0</sub>-Phase über. Diese Phase beschreibt den Zustand der Quieszenz, es findet keine Proliferation statt. Eine Zelle im G<sub>0</sub>-Zustand kann, z.B. nach Einwirken von Wachstumsfaktoren, wieder in den G<sub>1</sub>-Zustand zurückkehren und durchläuft dann den Zellzyklus [18-20].

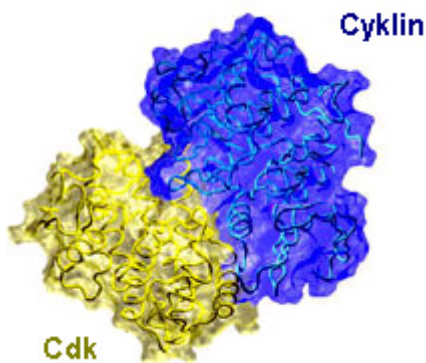
Die Replikation des Genoms und die Mitose in Zellen sind sich abwechselnde und voneinander abhängige Prozesse. Sie benötigen daher eine strenge Regulation. Wenn eine Zellzyklusphase nicht ordnungsgemäß abgeschlossen wurde, sorgen Kontrollpunkte, auch Restriktionspunkte genannt, dafür, dass der Verlauf des Zellzyklus unterbrochen wird. In jeder Phase des Zyklus sind solche Kontrollpunkte zu finden, die nur in bestimmter Signalkombination eine Fortsetzung erlauben. Ist das nicht der Fall, wird der Zyklus gestoppt und es kommt zur Reparatur der entsprechenden Fehler oder zum programmierten Zelltod, der Apoptose. Diese Kontrollpunkte überprüfen also die zeitlich korrekte und irreversible Abfolge des Zyklus, sie stellen eine Qualitätskontrolle der Zelle dar, bevor der Zyklus weiter durchgeschritten wird [14, 15, 21].

### **1.2    Cyklin-abhängige    Kinasen    –    die    Schlüsselenzyme    der Zellzyklusregulation**

Cyklin-abhängige Kinasen (Cdks) treiben den Zellzyklus auf molekularer Ebene an. Die Cdks gehören zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen. Sie sind alle annähernd gleich groß (34-40 kDa) und haben eine ähnliche Aminosäuresequenz [15, 22, 23]. In eukaryotischen Zellen wurden dreizehn Typen Cyklin-abhängiger Kinasen [24] gefunden, deren Bezeichnung durch Nummerierung (Cdk1-13) entsprechend der Reihenfolge ihrer Identifizierung im eukaryotischen Zellzyklus erfolgte. Cdks allein sind inaktiv, erst durch Bindung einer regulatorischen Untereinheit, den Cyklinen, werden sie aktiviert (Abbildung 2).

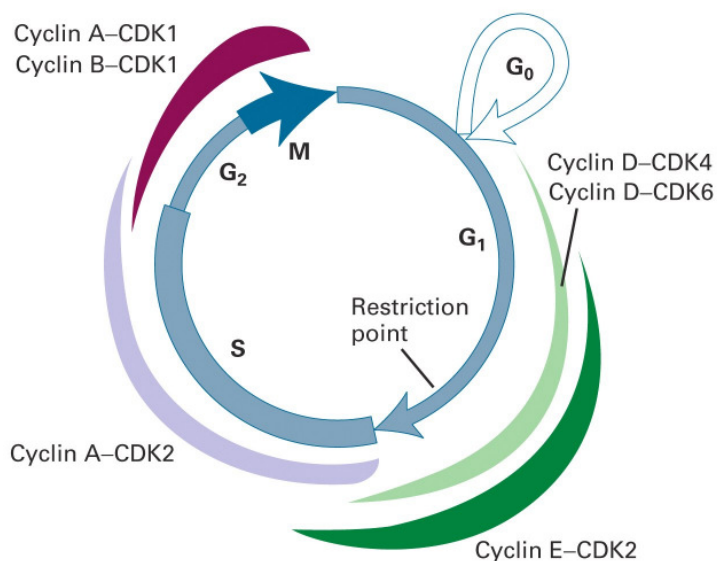
Cykline (Cyk) bilden eine Familie von Proteinen unterschiedlicher Größe. Ihre Familienzugehörigkeit wird durch eine Sequenzhomologie auf Aminosäureebene begründet. Diese Homologie, auch Cyklin Box genannt, umfasst 100 Aminosäuren und

ist für die Bindung an die Cdks nötig. Bisher konnten zehn Cyklinklassen (Cyklin A-K) identifiziert werden [24].



**Abbildung 2: Schematische Abbildung eines Cdk/Cyk-Komplexes**

Die verschiedenen Cdks werden durch Bindung spezifischer Cykline aktiviert, so bindet z.B. Cdk4 nur das Cyklin D, Cdk2 hingegen ist in der Lage Cyklin A oder Cyklin B zu binden. Die Aktivität dieser verschiedenen Komplexe kennzeichnet die einzelnen Phasen des Zellzyklus (Abbildung 3) [15, 22, 23].



**Abbildung 3: Modell der Regulation des eukaryotischen Zellzyklus**

Das Fortschreiten des Zellzyklus wird durch G<sub>1</sub>-, S-Phase-, und mitotischen Cdk/Cyk-Komplex reguliert.

Die Aktivierung der Cdks erfolgt durch eine Konformationsänderung nach der Bindung des Cyklins. Anschließend ist die Phosphorylierung des Threoninrests T160 möglich, wodurch die Aktivität des Proteinkomplexes weiter gesteigert wird. Einige Cdk/Cyk-Komplexe, wie z.B. der Cdk1/CykB-Komplex, können durch Phosphorylierung im aminoterminalen Bereich inaktiviert werden.

Die Regulation der Aktivität der Cykline erfolgt hauptsächlich über ihre zelluläre Konzentration in den einzelnen Phasen des Zellzyklus. Diese unterliegt starken

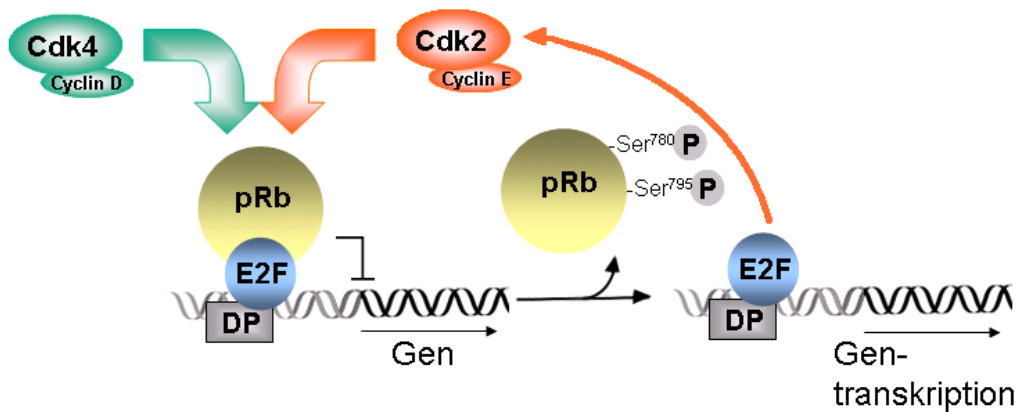
Schwankungen, da die verschiedenen Cdk/Cyklin-Komplexe phasenspezifisch exprimiert werden. Neben der unterschiedlichen Expression erfolgt die Regulation auch über die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Cdk/Cyk-Komplexe und der Expression von Inhibitoren der Cdks (Ckis). Im Zytoplasma können Cykline Ubiquitin-abhängig schnell abgebaut werden, so sind sie nur kurz aktiv [18, 25, 26].

Die verschiedenen Cdk/Cyk-Komplexe haben die Aufgabe, Proteinsubstrate des Zellzyklus zu phosphorylieren und sie somit zu aktivieren oder deaktivieren. In den folgenden Abschnitten 1.2.1-1.2.3 werden die Aufgaben der unterschiedlichen Cdk/Cyk-Komplexe näher betrachtet.

### 1.2.1 Die G<sub>1</sub>-Cdk/Cyk-Komplexe

In der frühen G<sub>1</sub>-Phase stimulieren Wachstumsfaktoren die Expression der D-Cykline. Das Cyklin D1, sowie seine Homologe D2 und D3, und die katalytischen Partner Cdk4 und Cdk6 regulieren die Aktivität der Retinoblastom-Proteine (pRb) in Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Die Rb-Proteine inhibieren verschiedene Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch den Transkriptionsfaktor E2F. Dadurch wird die Transkription von Genen, die für die DNA-Synthese während der S-Phase nötig sind, verhindert. Um den Zellzyklus fortsetzen zu können, muss pRb inaktiviert werden [27]. Das geschieht mittels Phosphorylierung durch die Cdk4/CykD- und Cdk6/CykD-Komplexe (Abbildung 4). Die Cyklin D-Konzentration wird über einen mitogeninduzierten Signalweg reguliert. Ist dieser Signalweg unterbrochen, kommt es zur Phosphorylierung von Cyklin D. Das phosphorylierte Cyklin D wird aus dem Kern exportiert und durch das Proteasom ubiquitinabhängig abgebaut [28, 29].

Das Cyklin E wird selektiv am Restriktionspunkt, dem Übergang von Phase G<sub>1</sub> nach S<sub>1</sub> durch E2F exprimiert und komplexiert die Cdk2. Die Phosphorylierung von pRb durch die beiden Cyklin D-Komplexe führt zur Expression des Cyklin E und zur Entstehung des Cdk2/CykE-Komplexes. Dieser Komplex ist auch an der Phosphorylierung des Retinoblastoms beteiligt (Abbildung 4). Ab diesem Punkt ist das Fortschreiten durch den Zellzyklus unabhängig von Cdk4, Cdk6 und den D-Cyklinen. Der Zellzyklus läuft nun weiter, auch wenn durch den Abfall der Konzentration der mitogenen Wachstumsfaktoren die Cyklin D Expression sinkt [5, 19]. Das Cyklin E wird auch ubiquitinabhängig durch Phosphorylierung abgebaut. Der Cdk2/CykE-Komplex sorgt in einer negativen Rückkopplung für seinen eigenen Abbau [30, 31].



**Abbildung 4: Regulation der Rb und E2F Aktivität in der späten G<sub>1</sub>-Phase**

Das pRb verbleibt bis zum Ende der Mitose in seiner phosphorylierten Form. Zu Beginn der neuen G<sub>1</sub>-Phase, fällt die Cyclin/Cdk-Konzentration sehr stark ab, so dass es zur Dephosphorylierung des pRb durch Phosphatasen kommt. Das hypophosphorylierte pRb inhibiert dann den Transkriptionsfaktor E2F in der frühen G<sub>1</sub>-Phase [32, 33].

Die G<sub>1</sub>-Cdk/Cyk-Komplexe bereiten somit die Zelle auf die S-Phase vor, indem sie die Expression von Enzymen und Genen, die für die DNA-Synthese benötigt werden, initiieren. Die Aktivität des S-Phasen-Cdk/Cyk-Komplexes wird durch einen Inhibitor unterdrückt. Die G<sub>1</sub>-Cdk/Cyk-Komplexe leiten am Ende der G<sub>1</sub>-Phase den Abbau dieses S-Phasen-Inhibitors ein [32].

### 1.2.2 Der S-Phasen Cdk/Cyk-Komplex

Das Cyclin A wird während der S- und der G<sub>2</sub>-Phase gebildet und stellt in Verbindung mit Cdk2 den S-Phasen-Cdk/Cyk-Komplex dar. Dieser Komplex phosphoryliert die Proteine, die den *DNA pre-replication complex* (Pre-RC) bilden. Der Beginn der DNA-Synthese wird bereits in der G<sub>1</sub>-Phase durch den Aufbau des Pre-RC vorbereitet. Die Phosphorylierung des Pre-RC leitet die DNA-Replikation ein und verhindert, dass sich ein neuer Pre-RC bildet. Dadurch wird sichergestellt, dass die DNA während eines Zellzyklus nur einmal verdoppelt wird [32, 34, 35].

### 1.2.3 Die mitotischen Cdk/Cyk-Komplexe

Cyclin A bildet auch mit Cdk1 einen Komplex. Dieser Komplex ist bis zum Ende der DNA-Synthese inaktiv und dann an der Einleitung der Mitose beteiligt.

Das Cyklin B bildet zusammen mit Cdk1 den *m-phase promoting factor* (MPF), dessen Aktivität essentiell für den Übergang in die Mitose ist. Die Cdk1/CykA- und Cdk1/CykB-Komplexe induzieren während der Mitose eine Reihe von Prozessen:

- die Kondensation der Chromatinfasern zu Chromosomen
- die Auflösung der Kernhülle
- die Ausbildung des Spindelapparates
- die Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte

Nachdem alle Chromosomen im Spindelapparat angeordnet sind, aktiviert der mitotische Cdk/Cyk-Komplex den *anaphase promoting complex* (APC), der den Abbau des Anaphasen-Inhibitors einleitet. Im Anschluss an die Anaphase werden die mitotischen Cykline APC-induziert abgebaut. Der Abfall der Konzentration dieser Cdk/Cyk-Komplexe erlaubt der Zelle die Zellteilung und den Neuaufbau einer Kernmembran in den gebildeten Tochterzellen [32, 35].

Während der frühen G<sub>1</sub>-Phase im Zellzyklus der Tochterzelle werden die Proteine des Pre-RC von Phosphatasen dephosphoryliert und können dann einen neuen Pre-RC aufbauen. Der APC wird während der späten G<sub>1</sub>-Phase inaktiviert und somit die Akkumulation der mitotischen Cykline während der S- und G<sub>2</sub>-Phase im Zellkern ermöglicht.

### 1.3 Inhibitoren der cyklinabhängigen Kinasen (Ckis)

Als zentrale Regulatoren des Zellzyklus sind die Cdks potentielle Zielmoleküle für verschiedene Inhibitoren. Durch die Hemmung von Cdks kann eine Unterbrechung des Ablaufs des Zellzyklus erreicht werden, was antiproliferierende Effekte nach sich zieht und somit auch in der Krebstherapie Anwendung finden soll [36].

#### 1.3.1 Natürliche Inhibitoren der cyklinabhängigen Kinasen

Die Inhibierung der Cdks *in vivo* wird weitestgehend von zwei Proteinfamilien mit jeweils unterschiedlichen biochemischen und funktionellen Homologien gesteuert, den Proteinen der Cip-/KipFamilie (Cdk inhibitory polypeptides, Kinase inhibitory proteins) und der INK4 Familie (*inhibitors of cyclin dependent kinase 4*). Zur Cip-/Kip-Familie gehören die Proteine p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup>. Diese universellen bzw. unspezifischen Cdk-Inhibitoren hemmen alle Cyklin/Cdks des Zellzyklus, bevorzugt

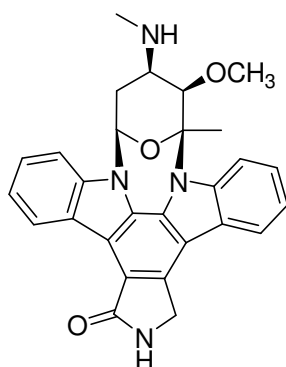
jedoch den Cdk2-Komplex. Diese drei Proteine besitzen eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz, die für die Inhibierung aller Cdk/Cyk-Komplexe notwendig ist. Der Inhibitor interagiert mit dem Cdk und verändert dessen Konformation. Zusätzlich ragt der Inhibitor in das aktive Zentrum der Kinase und blockiert ihre ATP-Bindungsstelle [30, 32, 37].

Zur INK4- Familie gehören die Proteine p15INK4b [38], p16INK4a [39], p18INK4c [40, 41] und p19INK4d [41, 42]. Die Vertreter dieser Familie interagieren spezifisch nur mit Cdk4/CykD- und Cdk6/CykD-Komplexen. Die Inhibitoren bestehen aus vier bis fünf Struktureinheiten, die als „Ankyrin-Repeats“ bezeichnet werden. Diese „Ankyrin-Repeats“ binden an einen nichtkatalytischen Abschnitt der Cdk4/6. Das führt zu einer Konformationsänderung, die die Inaktivierung der Cdk4/6 bewirkt. Die INK4-Familie verhindert die Progression der Zelle aus der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase, indem sie die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von pRb (vgl. 1.2.1) durch die Cyklin D-Komplexe unterbindet. Das hypophosphorylierte pRb hemmt die Aktivität der Transkriptionsfaktoren und verhindert dadurch die Expression des Cyklin E und der für die DNA-Synthese benötigten Gene. Aufgrund der spezifischen inhibitorischen Wirkung, ist die INK4-Familie auf die Anwesenheit von pRb in der Zelle angewiesen. In Abwesenheit von pRb exprimiert die Zelle das Cyklin E und die Zelle kann in die S-Phase übergehen [32, 43].

### 1.3.2 Synthetische Ckis erster Generation

Die spezifisch wirkenden Inhibitoren der ersten Generation stellen u.a. Verbindungen der Staurosporine, Flavonoide, Indigoide, Paullone und Purine dar [44].

Staurosporin ist ein Naturstoff, bei dem es sich um einen nicht-selektiven Inhibitor für Tyrosin- und Serin-Threoninkinasen handelt.

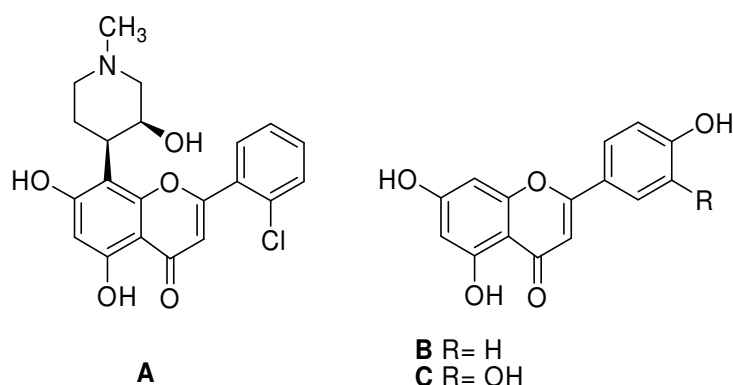


**Abbildung 5: Strukturformel des Staurosporins**



Das Staurosporin ist ein Alkaloid aus dem Pilz *Streptomyces Staurospores*, welches in vielen Zelllinien das Potential zeigt, den programmierten Zelltod auszulösen. Das Staurosporinmolekül (Abbildung 5) besteht aus einem Zuckermolekül und einer planaren, heterozyklischen Indolcarbazol-Einheit. Aufgrund dieser Struktur kann das Staurosporin mit der ATP-Bindungsstelle von Proteinkinasen wechselwirken. Durch die höhere Affinität des Inhibitors zur ATP-Bindungsstelle im Vergleich zum ATP kommt es zur kompetitiven Hemmung der ATP-Bindung [45].

Flavopiridol (**A**) zeigte in klinischen Studien seine Wirkung als Antitumor-Agens. Es führt sowohl den Zellarrest in der G<sub>1</sub>- und der G<sub>2</sub>- Phase als auch die Apoptose herbei, indem es die ATP-bindende Seite der Cdks 1, 2 und 4 blockierte. Flavopiridol wurde bei Patienten mit Prostata-, Magen-, Darm- und Nierenkrebs eingesetzt. Die Struktur (Abbildung 6) dieser halbsynthetischen Verbindung leitet sich vom Alkaloid Rohitukin ab. Die zwei natürlich vorkommenden, polyhydroxylierten Flavopiridolderivate Genistein (**B**) und Quercitin (**C**) sind zwar von der gleichen Leitstruktur abgeleitet, zeigen aber gegenüber den Cdks eine sehr geringe Aktivität (Tabelle 1) [46, 47].



**Abbildung 6: Flavopiridol (A) und natürlich vorkommende Derivate Genistein (B) und Quercitin (C)**

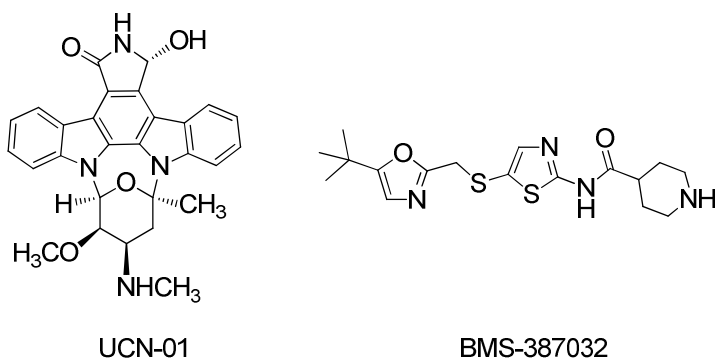
**Tabelle 1: IC<sub>50</sub>-Werte der Flavopiridol-Derivate [47]**

Verbindung	IC <sub>50</sub> [μM]	IC <sub>50</sub> [μM]	IC <sub>50</sub> [μM]
	Cdk1/CykB1	Cdk2/CykE	Cdk4/CykD1
<b>A</b>	0,2	0,2	0,2
<b>B</b>	370	-	250
<b>C</b>	20	-	61

## 1.4 Cyklin-abhängige Kinasen als Targets zur Tumordiagnostik/-therapie

Die meisten Defekte in Zellen, die mit der Regulation des Zellzyklus zusammenhängen, werden durch eine Fehlregulation der Cdk4- bzw. Cdk6-Aktivität verursacht [4-7]. Daher stellen diese beiden Cdk's ein sehr attraktives Target für die Krebsdiagnose und -therapie dar [48, 49]. In den letzten Jahren wurde eine große Zahl an selektiven Cdk4/6-Inhibitoren (Cki4/6), deren prinzipielle Eignung anhand von  $IC_{50}$ -Werten belegt wurde, in der medizinisch-chemischen Literatur veröffentlicht [10, 50-52]. Verschiedenste „drug discovery“-Programme führender Pharmafirmen, wie z.B. Pfizer, waren in der Lage kleine potente Moleküle, die Cdk4/6-inhibierend wirken, zu identifizieren.

Trotz allem inhibieren die meisten vorgestellten Ckis viele verschiedene Cdk's gleichzeitig, vor allem jedoch Cdk2 und Cdk1 [53, 54]. Einige dieser Substanzen, wie z.B. Flavopiridol (Abbildung 6), UCN-01 oder BMS-387032 (Abbildung 7), sind bereits in der (prä-)klinischen Untersuchung.



**Abbildung 7: Strukturformel von UCN-01 und BMS-387032 [46, 55-58]**

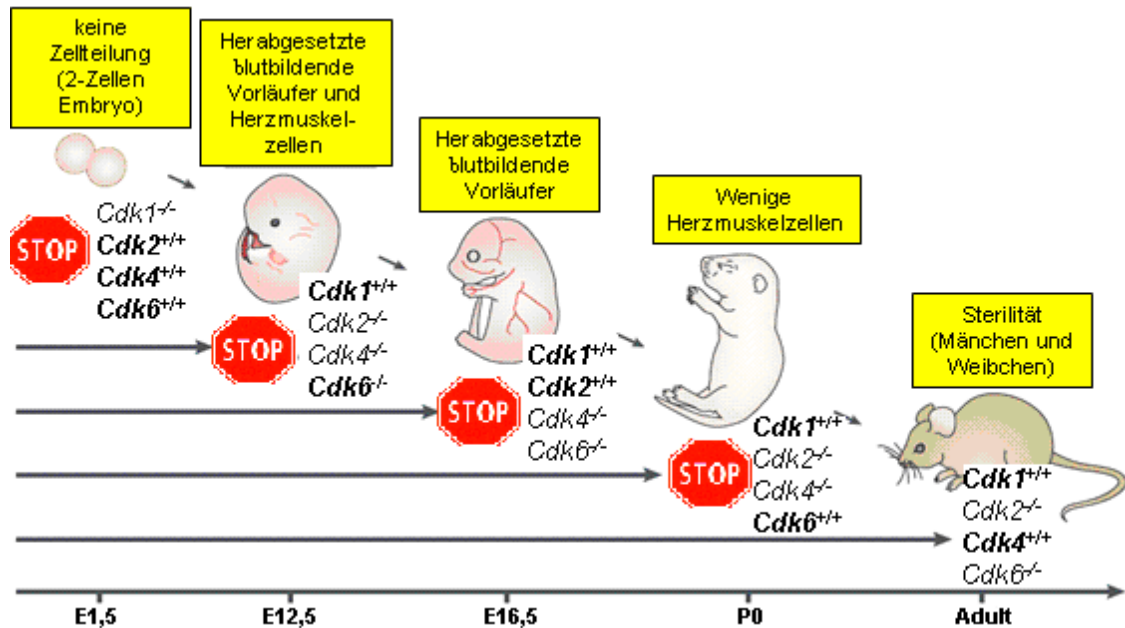
In der Literatur wird berichtet, dass sich Zellen auch in Abwesenheit von Cdk2 weiter vermehren und wachsen [59]. Es konnte also gezeigt werden, dass Cdk2 nicht essentiell für das Zellwachstum in verschiedenen Zelllinien ist [60]. Cdk2-*knock out* (Cdk2<sup>null</sup>)-Zellen des embryonalen Bindegewebes (MEF, *mouse embryo fibroblasts*) sind in der Lage, zu proliferieren. Quieszente Zellen können wieder in den Zellzyklus zurückkehren, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit als Cdk2-aktive MEFs. Cdk2<sup>null</sup>-Mäuse sind lebensfähig und gesund, abgesehen von ihrer Sterilität aufgrund von meiotischen Defekten. Ihre Lebensdauer unterscheidet sich nicht von normalen Mäusen [59].

Es wurden auch Mäuse ohne Expression verschiedener Cdk2-Bindungspartner, wie Cyklin E und A untersucht. Cyklin A<sub>1</sub>-*knock out* Mäuse sind lebensfähig, wenn auch männliche Exemplare Sterilität aufweisen [61], Cyklin A<sub>2</sub>-*knock out* Mäuse hingegen sterben schon während der frühen Embryonalphase [62].

Ein Fehlen der beiden Cykline E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> resultiert ebenfalls im Tod der Embryonen [63, 64]. Auch Cyklin E-*knock out* MEFs sind nicht in der Lage, nach der Quieszenz wieder in den Zellzyklus zurückzukehren [63]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass Cdk2 in Tumoren genetisch nicht verändert ist. Allerdings scheint die Expression der direkten Regulatoren wie Cyklin E und p27 in humanen Tumorzelllinien gestört zu sein [65]. Eine Inhibierung von Cdk2 ist demnach nicht sinnvoll, da der Körper anscheinend in der Lage ist, das zu kompensieren.

Ein Fokus auf andere Kinasen, wie die Cdk4/6, ist vielversprechender. Viele biologische Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass Cdk4/6 die wichtigsten Cdk's für die Regulation des Zellzyklus darstellen. So konnten Kozar *et al.* [66] und Malumbres *et al.* [67] zeigen, dass Cyklin D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>-*knock out* (Cyklin-D<sup>null</sup>)- sowie Cdk4/6<sup>null</sup>-Mäuse nicht lebensfähig sind. Bei den Cyklin D<sup>null</sup> Mäusen zeigte sich eine normale Embryonalentwicklung, jedoch nur bis zum 13. Tag. Das gibt Grund zu der Annahme, dass der Zellzyklus auch Cyklin D-unabhängig ablaufen kann, allerdings nur während der frühen Embryonalphase [66]. Cdk4/6<sup>null</sup> Mausembryonen entwickeln sich bis zum 14. Tag der Embryonalphase und sterben dann (Abbildung 8). Sie zeigen ähnliche Symptome wie Cyklin D<sup>null</sup> Mäuse, was ebenfalls Hinweise darauf gibt, dass der Zellzyklus in der Embryonalphase Cdk4/6 unabhängig ablaufen kann [67]. Für beide *knock out* Varianten konnte in MEF-Zellen des Weiteren eine bis zu 50% verringerte Geschwindigkeit in der Wiederaufnahme des Zellzyklus unter Einfluss von mitogenen Faktoren im Vergleich zu normalen MEF-Zellen festgestellt werden [66, 68].

Malumbres *et al.* stellten weiterhin eine Komplexbildung von Cdk2 mit D-Cyklinen fest. Da dieser Komplex pRb-Aktivität aufweist, lässt sich vermuten, dass das Cdk2 für die fehlenden Cdk4/6 einspringt, wenn auch mit wesentlich geringerer Effizienz [68].



**Abbildung 8: Genetische Untersuchung der Rolle der Cdk in Zellen von Säugetieren [69]**

Wildtyp Cdk's fett geschrieben. Der Pfeil zeigt an, wie weit sich ein Mausembryo mit dem dargestellten Cdk-Satz entwickelt.

Davon ausgehend spielen sowohl die Cdk4/6/CykD- als auch die Cdk2/CykE-Komplexe keine essentielle Rolle für den somatischen Zellzyklus, wenn man sie getrennt voneinander betrachtet [70]. Eine Betrachtung bei Abwesenheit beider Komplexe war bisher noch nicht möglich, da sich das entsprechende Mausmodell noch nicht erzeugen ließ [67].

Die bisherigen Ergebnisse implizieren jedoch, dass Cdk2 nicht die ideale Zielstruktur für die Entwicklung von kleinen Inhibitormolekülen zur Tumorbildung darstellt. Aufgrund der Kompensation der fehlenden Cdk2-Aktivität durch Cdk4/6 sowie der Hochregulation der Cdk4-Aktivität in vielen Tumorzellen erweisen sich die Cdk4/6 als wichtigere Zellzyklustargets. Des Weiteren kann eine Punktmutation sowohl im Cdk4- als auch im Cdk6-Gen auftreten, die zu einer Substitution der Aminosäure Arginin an Position 24 des Cdk4/6-Proteins (*Cdk4/6*<sup>R24C</sup>) durch ein Cystein führt. Diese Punktmutation bringt eine Unempfindlichkeit der Cdk4/6 gegenüber ihren natürlichen Inhibitoren, den INK4-Proteinen, mit sich und wurde für verschiedene humane Melanomzelllinien beschrieben, bei denen sie das Tumorstadium und die Metastasierung fördert [70, 71].

Für die Tumordiagnose und -behandlung ist es allerdings sinnvoll, Inhibitoren einzusetzen, die nach dem „playing dirty“-Konzept [71] alle am Zellzyklus beteiligten Cdk's blockieren. Da die Tumorzellen sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden, besteht so die Möglichkeit, alle proliferierenden Tumorzellen abzubilden. Um

eine Kinase genauer charakterisieren zu können, benötigt man spezifische und selektive Inhibitoren dieser Kinase.

Da in der Literatur gezeigt wurde, dass Cdk4 und Cdk6 sehr ähnliche Proteine mit praktisch ununterscheidbaren biochemischen Eigenschaften sind [67], können diese beiden Kinasen im normalen Mausmodell nicht voneinander getrennt untersucht werden. Dazu mussten spezielle Mausmodelle entwickelt werden, in denen jeweils eine der beiden Cdk's nicht exprimiert wird, um die jeweils andere Cdk untersuchen zu können. Die Funktion der ausgeschalteten Cdk übernimmt dann die andere. So zeigte sich in Cdk4<sup>null</sup>-MEFs und Cdk4<sup>null</sup>-Mäusen eine erhöhte Konzentration an Cdk6, einhergehend mit einer normalen Zellproliferation [72].

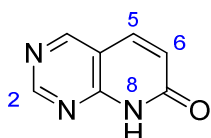
Bei der Suche nach speziellen Inhibitoren für die Cdk4/6 wurden zwei Hypothesen entwickelt. Zum einen muss die Struktur des Inhibitors bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sein. Diese positive Ladung resultiert in einer günstigen Coulomb-Energie, die die Interaktion mit der ATP-Bindungsstelle im Cdk4/6 ermöglicht und die Reaktion mit der aktiven Seite der Cdk2 verhindert. Zum anderen muss der Substituent ungefähr dieselbe Größe wie das ATP-Molekül aufweisen, um effektiv an die Bindungsstelle anzudocken [49]. Substanzen, die diese Eigenschaften erfüllen, entstammen verschiedenen chemischen Strukturklassen, wie z.B. Purin- und Pyrimidin-Analoga, Indenopyrazole, Oxindole, Pyridopyrimidine, Pyrazolopyrimidine, Indolocarbazole, Pyrrolocarbazole und Aminothiazole [52]. Einige der in der Literatur beschriebenen Cdk's führen zu einem G<sub>1</sub>-Arrest des Zellzyklus. Die spezifische Inhibierung der Cdk4/6/Cykd Komplexe resultiert in einer pRb Hypophosphorylierung. Diese synthetischen Cdk4-Inhibitoren verursachen somit eine ähnliche Wirkung wie die Inhibitoren der INK4-Familie. Der G<sub>1</sub>-Arrest der Zellen belegt, dass das Ausschalten der Cdk4/6 die Zellproliferation verhindert [49, 73, 74]. Unter Einwirkung des Inhibitors PD0332991 (Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Grundgerüst, entwickelt durch Pfizer) konnte sogar der Rückgang von Tumoren in humanen Xenograft-Mausmodellen beobachtet werden [10].

### **Strukturklasse der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine**

Bizyklische Heterozyklen, wie z.B. Purine, Chinazoline und Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine, sind häufig eingesetzte pharmakophore Strukturen bei der Entwicklung von *Lock-and-Key* Modellen für die Ligand-Rezeptor-Erkennung [75]. Bei der Suche nach geeigneten Inhibitoren der Cdk's erwies sich das Grundgerüst der

Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine als sehr variable Struktur, mit der sich niedrigste  $IC_{50}$ -Werte (Inhibitorkonzentration in mol, bei der 50% des Enzyms inhibiert werden) erzielen lassen. Die Struktur bietet vier mögliche Anbindungsstellen für Substituenten, die die Aktivität des Inhibitors beeinflussen (in 2, 5, 6 und 8-Position, Abbildung 9). In der Literatur werden geeignete Substituenten für die Inhibierung von Cdk4 und 6 beschrieben.

Aufbauend auf der Entwicklung von 6-Aryl-substituierten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-on-Derivaten als Tyrosinkinaseinhibitoren (die gegen Cdk4 keine Wirkung zeigten), konnten Barvian *et al.*, 2000 [8], in Position 6 unsubstituierte Derivate als Cdk4/6 Inhibitoren vorstellen.

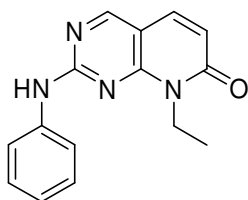


**Abbildung 9: Leitstruktur der Derivate für die Cdk4/6 Inhibitor-Entwicklung**

In blau die Bezeichnung der Atome.

Das Modell zur Entwicklung der Tyrosinkinaseinhibitoren, aufbauend auf EGFR (Epidermal-Growth-Factor-Receptor), FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), PDGFR (Platelet derived growth factor Receptor) und cSRC (proto-oncogenic tyrosine kinase) zeigt, dass der Arylrest der Inhibitoren bei Tyrosinkinasen tief in eine Tasche passt, die sich an die ATP-Bindungsstelle anschließt. Bei Cdk4 hingegen ist diese Tasche durch große Aminosäureseitenketten versperrt, der Inhibitor kann also nicht in diese Tasche gelangen. Ein guter Inhibitor gegen Cdk4/6 darf daher nicht an Position 6 Aryl-substituiert sein, um in die ATP-Bindungstasche zu passen.

Barvian *et al.*, konnten ihre Überlegungen mit einem, nach dieser Hypothese entwickelten, Cdk4/6-selektiven Inhibitor untermauern (Verbindung **D**, 8-Ethyl-2-(4-phenylamin)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-on, Abbildung 10). **D** inhibiert Cdk4/6/cykD mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0,62  $\mu$ mol und zeigt eine gewisse Selektivität gegenüber anderen Kinasen wie z.B. FGFR ( $IC_{50}$  = 3,7  $\mu$ mol) und cSRC ( $IC_{50}$  = 21  $\mu$ mol) [8]. Derivate der Verbindung **D** wurden einer eingehenden Struktur-Aktivitätsanalyse unterzogen, die ergab, dass Aniline in Position 2 höhere inhibitorische Wirkung zeigen als Alkylamine.

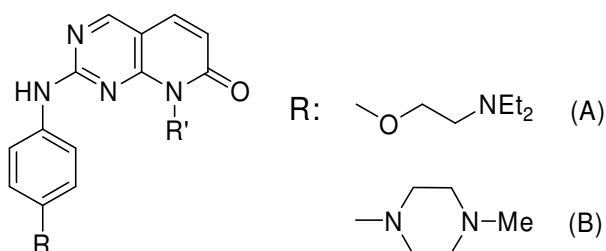


**Abbildung 10: Verbindung D [8]**

Das vorgeschlagene Bindungsmodell (ausgehend von Cdk2, da bisher noch keine Cdk4-Kristallstruktur vorliegt) zeigt eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Carbonyl-Sauerstoff des Val-96 (Leu-83 nach Cdk2-Modell) und dem sekundären Amin des Anilins.

Elektronenarme Derivate der Verbindung **D** stellen schlechtere Inhibitoren dar als elektronenreiche, allerdings konnte bei Darstellung verschiedener Sauerstoff-substituierter Derivate des Anilin-Aromaten festgestellt werden, dass die Position des elektronenliefernden Substituenten einen großen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung hat. Ortho-substituiertes Methoxyanilin zeigte z.B. keinerlei Wirkung gegen Cdk4, das para-substituierte Methoxyanilin-Derivat jedoch vergleichbare Wirkung wie **D**. Stickstofftragende Substituenten in para-Position erhöhen die inhibitorische Wirkung um ein Vielfaches, da diese Substituenten vermutlich die negative Ladung des Asp-86 (nach Cdk2-Modell) abfangen.

Nachdem nun C2-Seitenketten, die einen IC<sub>50</sub>-Wert von unter 0,1 µmol bewirken, identifiziert wurden, richtete sich die Aufmerksamkeit auf die N8-Position. Es konnte gezeigt werden, dass an dieser Stelle große hydrophobe Strukturen nötig sind, um den Platz in der Enzymtasche effektiv zu füllen. Cycloalkylgruppen erfüllten diese Aufgabe und ergaben nanomolare IC<sub>50</sub>-Werte. Vor allem die in Tabelle 2 aufgeführten Verbindungen **E**, **F** und **G** (Abbildung 11) weisen sehr niedrige IC<sub>50</sub>-Werte für den Cdk4-Komplex auf [8, 11]. Die Arbeitsgruppe um Barvian konnte weiterhin feststellen, dass schon marginale Änderungen des Substituenten an der Position 8 entscheidenden Einfluss auf die Selektivität haben. So kann eine Ethylkette an Position 8 schon zu einem Cdk1/CykB-Inhibitor führen, der kaum Wirkung gegenüber Cdk4/CykD zeigt [8, 11].



**Abbildung 11: Grundgerüst der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate und Substituenten für Rest R [8]**

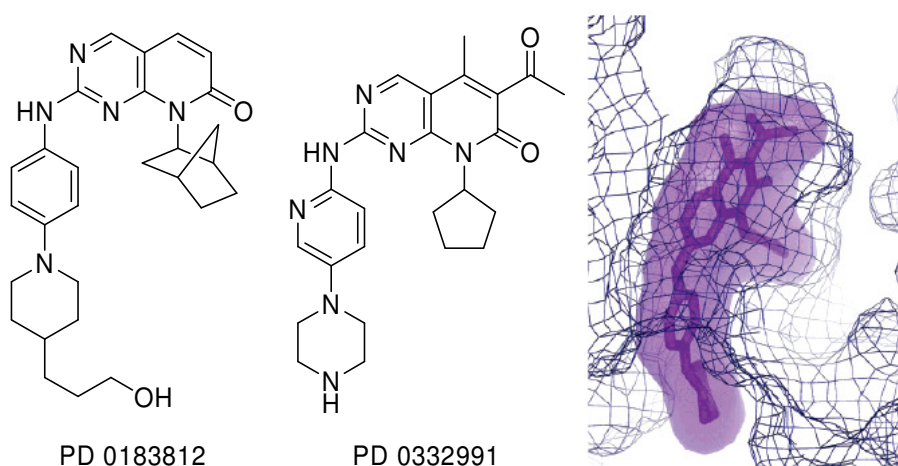
**Tabelle 2: IC<sub>50</sub>-Werte der Inhibitoren [8]**

Verbindung	R	R'	IC <sub>50</sub> in µM			
			Cdk4/cykD	Cdk1/cykE	Cdk2/cykA	Cdk2/cykE
<b>E</b>	A	Cyclopentyl	0,0007	n.b.	n.b.	n.b.
<b>F</b>	B	Isopropyl	0,032	0,675	0,058	0,270
<b>G</b>	B	Cyclohexyl	0,004	0,079	0,015	0,02

Toogood *et al.* konnten zeigen, dass ein Cyclopentylring an Position 8 die beste Kombination aus Selektivität und Affinität ergibt [12]. Der Austausch des Anilins an der 2-Position gegen ein 2-Aminopyridin brachte zwar eine Verringerung der inhibitorischen Wirkung mit sich, jedoch zeitgleich einen hohen Anstieg in der Selektivität der Verbindung für Cdk4/CykD gegenüber Cdk2/CykA [12].

Die Einführung einer Methylgruppe an Position 5 brachte einen Anstieg der Affinität, wenn sich in Position 6 ein Acetyl- oder Ethylesterrest befand. Bei Einführung eines Bromsubstituenten in Position 6 konnte allerdings ein Rückgang der Affinität festgestellt werden. [12]. Jedoch zeigten VanderWel *et al.* [13], dass eine Methylierung an Position 5 eine eindeutige Verbesserung in Bezug auf die Selektivität für Cdk4/CykD gegenüber Cdk1/CykB, Cdk2/CykA und Cdk2/CykE bringt. Wahrscheinlich limitiert die Aminosäure Phe-80 der Cdk2 (und Cdk1) den Platz in der Bindungstasche, so dass eine in C5 methylierte Verbindung nicht aufgenommen wird. Ein größerer Substituent passt allerdings auch nicht in die Bindungstasche der Cdk4. Bei dem Versuch den Methylsubstituenten durch eine Ethylgruppe zu ersetzen, wurde eine Verringerung der inhibitorischen Wirkung um das 50fache festgestellt [13].

Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurden 2001 und 2004 von Fry *et al.* [9, 10] zwei sehr potente Inhibitoren der Cdk4/6 vorgestellt, PD 0183812 und PD 0332991 (Abbildung 12), die sehr niedrige IC<sub>50</sub>-Werte erzielen (Tabelle 3).



**Abbildung 12: Strukturformel von PD 0183812 und PD 0332991, Oberflächendarstellung des gebundenen Inhibitor in der Bindungstasche des Cdk6-Moleküls [9, 10, 76]** Die Oberfläche des Inhibitors wird durch die transparent-violette Form wiedergegeben, die Strukturformel ist in violett dargestellt.

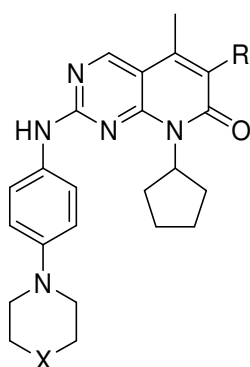
**Tabelle 3: IC<sub>50</sub>-Werte für beide Verbindungen [9, 10]**

	IC <sub>50</sub> in $\mu\text{M}$			
	Cdk4/CykD	Cdk6/CykD	Cdk2/CykE	Cck2/CykA
PD 0183812	0,008	0,013	0,165	0,209
PD 0332991	0,011	0,015	> 10	> 10



Bei der Anwendung beider Verbindungen konnte der G<sub>1</sub>-Arrest in humanen Tumorzelllinien festgestellt werden. Die DNA-Synthese und die Zellproliferation konnte so unterbunden werden. Beide Verbindungen ermöglichen es, den Zellzyklus ausschließlich in der G<sub>1</sub>-Phase zu stoppen. Allerdings wurde festgestellt, dass bei Zelllinien ohne Retinoblastom-Proteine keine Inhibierung der DNA-Synthese möglich ist [9, 10, 76].

VanderWel *et al.*, 2005 [13], stellten im Rahmen ihrer Untersuchungen zur optimalen Seitenkette an C5- und C6-Position eine Reihe von Pyrido[2,3-*d*]-pyrimidin-Derivaten vor (Abbildung 13), die sehr niedrige IC<sub>50</sub>-Werte im nanomolaren Bereich aufweisen (Tabelle 4) und sehr selektiv Cdk4/6 inhibieren [12, 13].



**Abbildung 13: Grundgerüst der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Derivate**

**Tabelle 4: IC<sub>50</sub>-Werte von Derivaten der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine [13]**

#	R	X	IC <sub>50</sub> in $\mu$ M			
			Cdk4/CykD	Cdk1/CykB	Cdk2/CykA	Cdk2/CykE
H	H	NMe	0,018	> 5	> 5	> 5
I	H	NH	0,014	> 5	> 5	> 5
J	I	NH	0,005	1,865	0,443	0,365
K	COMe	NH	0,002	n.b.	0,230	n.b.
L	COOMe	NH	0,004	> 5	2,819	> 5

Aufgrund der erfolgsversprechenden Eigenschaften der Substanzen wurden diese als Basis für die zu entwickelnden Radiotracer genutzt.

### 1.5 Das Radiotracerprinzip und die Grundlagen der Positronen-Emissions-Tomographie

Nach der Entdeckung der natürlichen Radioaktivität durch den Physiker Henri Becquerel im Jahre 1896 war der Weg zur Anwendung in der Medizin nicht weit. George de Hevesy (1885-1966, Abbildung 14) fand heraus, dass man mit verschwindend geringen Mengen eines radioaktiven Isotops Transportprozesse analysieren kann. Dies wird Radiotracer-Prinzip genannt und ist hilfreich, um Informationen über Stoffwechselvorgänge im Körper zu gewinnen.



**Abbildung 14: George de Hevesy – „Vater der Nuklearmedizin“ (1885 - 1966)**

Als Radiotracer werden radioaktive Atome oder radioaktiv markierte Verbindungen bezeichnet, die es ermöglichen, chemische und/oder physiologische Prozesse mittels ionisierender Strahlung zu verfolgen. Aufgrund der geringen Nachweisgrenze bei der Messung ionisierender Strahlung reichen niedrigste Stoffmengen (pmol/nmol) des Radiotracers aus. So können physiologische Prozesse untersucht werden, ohne dass der Radiotracer einen Einfluss auf das System nimmt. Das bildgebende Verfahren der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglicht damit die quantitative Erfassung biochemischer und physiologischer Stoffwechselprozesse *in vivo* und die dreidimensionale Darstellung der untersuchten Vorgänge. Sie wird unter anderem in der Onkologie, Neurologie und Kardiologie für die klinische Diagnostik eingesetzt. Darüber hinaus wird die PET auch intensiv für die medizinische Forschung genutzt. In diesem Zusammenhang kommt ihr im Rahmen der molekularen Bildgebung eine besondere Bedeutung zu [77]. Eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz der PET in der bildgebenden klinischen Diagnostik und medizinischen Forschung ist die Verfügbarkeit von PET-Radiotracern. Das sind biologisch aktive Substanzen, wie zum Beispiel Zucker, Aminosäuren, Nukleoside, Oligonukleotide oder

Proteine, die zur Nutzung für die PET mit Positronen-emittierenden Nukliden markiert sind. In Tabelle 5 sind einige wichtige PET-Radionuklide zusammengestellt.

**Tabelle 5: Wichtige PET-Radionuklide**

Radionuklid	$t_{1/2}$	Umwandlungsart [%]	max. $\beta^+$ -Energie [MeV]	max. Reichweite $\beta^+$ [mm in H <sub>2</sub> O]
Kohlenstoff-11	20,3 min	$\beta^+$ : 99,8 EC: 0,2	0,96	4,1
Stickstoff-13	10,0 min	$\beta^+$ : 100	1,19	5,4
Sauerstoff-15	2,0 min	$\beta^+$ : 99,9 EC: 0,1	1,70	8,2
Fluor-18	109,8 min	$\beta^+$ : 96,9 EC: 3,1	0,63	2,4
Iod-124	4,18 d	$\beta^+$ : 22,9 EC: 77,1	2,14	6,9-10,2
Kupfer-64	12,7 h	$\beta^-$ : 39,0 $\beta^+$ : 17,4 EC: 41,0	0,65	

EC: Elektroneneinfang  
 $\beta^+$ :  $\beta^+$ -Umwandlung (Positronenemission)  
 $\beta^-$ :  $\beta^-$ -Umwandlung (Elektronenemission)

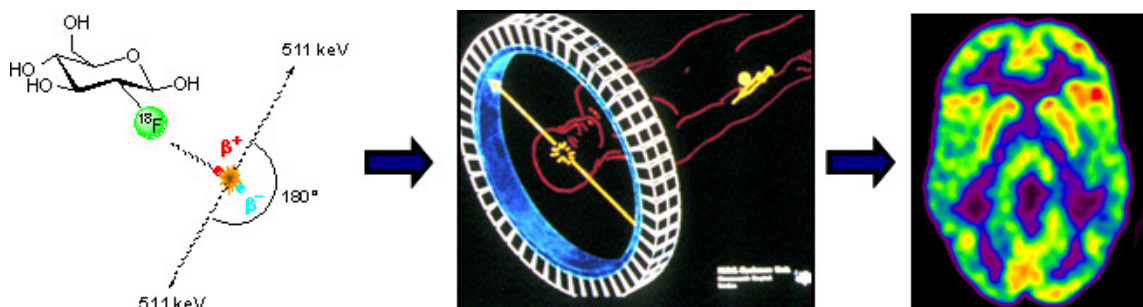
Bei den verwendeten Radionukliden handelt es sich um neutronenarme Kerne, die sich unter Positronenemission ( $\beta^+$ -Umwandlung) oder Elektroneneinfang stabilisieren. Beim Elektroneneinfang (EC, electron capture) kommt es zur Entstehung eines Neutrons (n) aus einem Proton (p) und einem Elektron ( $e^-$ ), zusätzlich wird ein Neutrino ( $\nu$ ) emittiert. Zur Aussendung eines Positrons ( $e^+$ ), dem Antiteilchen des Elektrons, kommt es, wenn sich der Kern unter Umwandlung eines Protons in ein Neutron stabilisiert. Dabei wird ebenfalls ein Neutrino emittiert (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Elektroneneinfang und  $\beta^+$ -Umwandlung.**

Elektroneneinfang (EC)	${}^A_Z X + e^- \rightarrow {}^A_{Z-1} Y + \nu$	A	Nukleonenzahl
		Z	Kernladungszahl
		$e^-$	Elektron
$\beta^+$ -Umwandlung	${}^A_Z X \rightarrow {}^A_{Z-1} Y + e^+ + \nu$	$e^+$	Positron
		$\nu$	Neutrino

Für die PET wird die  $\beta^+$ -Umwandlung genutzt. Das emittierte Positron verliert durch Stoßprozesse mit Elektronen im umliegenden Gewebe schrittweise seine kinetische Energie, bis es zur Positron-Elektron-Annihilation, der Paarvernichtung, kommt. Die

dabei frei werdende Energie, die Annihilationsstrahlung, wird in Form von zwei  $\gamma$ -Quanten mit einer Energie von je 511 keV in einem Winkel von ca.  $180^\circ$  abgegeben [78, 79]. Durch ein ringförmig um den Untersuchungsgegenstand angeordnetes Detektorsystem mit in Koinzidenz geschalteten Detektorpaaren kann der Ort der Annihilation erfasst werden [80]. Werden beide  $\gamma$ -Quanten von zwei in Koinzidenz geschalteten Detektoren innerhalb eines Zeitfensters von wenigen Nanosekunden registriert, so liegt der Ort der Annihilation auf der Verbindungsline zwischen beiden Detektoren, der „LOR“ (*line of response*). Um die Aktivitätsverteilung im Untersuchungsobjekt möglichst genau bestimmen zu können, benötigt man viele Koinzidenzen. Daher ist ein Detektor nicht nur mit dem ihm genau gegenüberliegenden Detektor in Koinzidenz geschaltet, sondern fächerförmig mit den umliegenden Detektoren. Ein Detektor besteht aus Szintillationskristallen mit nachgeschalteten Sekundärelektronenvervielfachern mit Photokathoden. Die auftreffenden  $\gamma$ -Quanten treten mit den Kristallatomen in Wechselwirkung, wobei sie ihre Energie auf die Elektronen des Kristalls übertragen und diese so in einen angeregten Zustand überführen. Bei der Rückkehr in den Grundzustand werden Lichtblitze (Szintillation) emittiert, die von den Sekundärelektronenvervielfachern mit Photokathoden detektiert und in elektrische Impulse umgewandelt werden. Ein Datenerfassungssystem mit Auswertungssoftware ermöglicht die Darstellung von dreidimensionalen Abbildungen mit der quantitativen Verteilung der Positronen-emittierenden Substanz (Abbildung 15). Regional ablaufende physiologische Prozesse können durch dynamische Messungen über einen längeren Zeitraum mit Hilfe vom Kompartiment-Modellen *in vivo* erfasst und quantifiziert werden und somit sind pharmakokinetische Aussagen über Transport- oder Umsatzraten sowie Konzentrationen möglich [81, 82]. Mit anderen bildgebenden Verfahren der Medizin, wie Röntgen-Computer-Tomographie (CT) und Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), die morphologische Strukturen abbilden, ist eine Bildgebung auf molekularer Ebene nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich.



**Abbildung 15: Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie**

Während der PET-Untersuchung wird nur der Ort der Annihilation, nicht der Ort der Radionuklid-Umwandlung detektiert. Daher spielt die Energie des Positrons, und somit die Weglänge, die es im Gewebe zurücklegt, eine große Rolle für die räumliche Auflösung der entstehenden Bilder. Je geringer die Energie, desto geringer die Weglänge, desto größer die räumliche Auflösung [83]. Bei der Verwendung von Radionukliden, die zusätzlich  $\gamma$ -Strahlung mit vergleichbarer Energie (z.B.  $^{124}\text{I}$ : 602 keV) abgeben, kann es zu falsch-koinzidenten Ereignissen kommen. Für den Detektor ist ununterscheidbar, ob beide  $\gamma$ -Quanten aus einem Annihilationsprozess stammen oder ein zufällig gleichzeitiges Auftreffen eines Annihilationsphotons und der  $\gamma$ -Strahlung auf ein koinzidentes Detektorpaar vorliegt [84]. Diese falschen Koinzidenzen bewirken eine schlechtere Auflösung einhergehend mit einem hohen Untergrundrauschen.

### 1.6 Die Positronen-emittierenden Radionuklide $^{18}\text{F}$ und $^{124}\text{I}$

Für die in Biomolekülen vorkommenden Atome Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff existieren  $\beta^+$ -emittierende Isotope, die prinzipiell für eine isotope Markierung verwendet werden können. Da für Wasserstoff kein  $\beta^+$ -emittierendes Isotop existiert, wird dieser häufig durch  $^{18}\text{F}$  ersetzt, wie zum Beispiel bei 2- $^{18}\text{F}$ Fluor-2-desoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ FDG) (Abbildung 15). Dabei wird ausgenutzt, dass das Fluor-Atom einen ähnlichen Van-der-Waals-Radius aufweist wie das Wasserstoff-Atom. Allerdings kommt es aufgrund der geänderten Polarität zu Veränderungen des Moleküls, die bei der Bewertung der Ergebnisse mit in Betracht gezogen werden müssen [85].

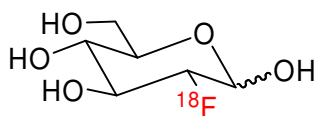


Abbildung 16: Strukturformel des  $^{18}\text{F}$ FDG

$^{18}\text{F}$  ist ein ideales PET-Radionuklid. Die relativ lange Halbwertszeit von 109,8 min erlaubt mehrstufige Radiosynthesen, sowie die Untersuchung von relativ langsam ablaufenden biologischen Prozessen. Außerdem kann aufgrund der Halbwertszeit die Versorgung von Kliniken ohne eigenes Zyklotron über ein sogenanntes Satellitenkonzept realisiert werden. Die niedrige maximale  $\beta^+$ -Energie von  $^{18}\text{F}$  (635 keV) resultiert in einer hohen Auflösung der PET-Bilder.

$^{18}\text{F}$  in der chemischen Form von  $[^{18}\text{F}]$ Fluorid kann in großen Mengen über die  $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion ausgehend von einem mit  $^{18}\text{O}$  angereicherten Wassertarget (>95%) am Zyklotron hergestellt werden [86]. Die Herstellung erfolgt ohne den Zusatz von nicht-radioaktivem  $^{19}\text{F}$  (no-carrier-added, n.c.a.), um eine hohe spezifische Aktivität zu erzielen. Allerdings kommt es durch Verunreinigungen aus der Umgebung, z.B. durch die Kunststoffleitungen des Targetsystems zum Eintrag an Fluor-19 [87]. Dieser Herstellungsprozess ist aufgrund des hohen Wirkungsquerschnitts und der hohen erzielbaren Targetausbeuten die am häufigsten eingesetzte Variante für die Darstellung von n.c.a.  $[^{18}\text{F}]$ Fluorid.

$^{124}\text{I}$  ist ein sowohl diagnostisch als auch therapeutisch eingesetztes Radionuklid, das sich zu 22% durch Positronenemission und zu 78% durch Elektroneneinfang stabilisiert [88]. Mit einer Halbwertszeit von 4,18 Tagen erlaubt es auch die Untersuchung sehr langandauernder Prozesse.  $^{124}\text{I}$  findet bisher noch keine weite Anwendung in der PET-Chemie, da der geringe Positronenemissionsanteil und ein komplexes Zerfallsschema die Bildgebung erschweren [89]. Aufgrund fortwährender Weiterentwicklung erreichen Kleintier-PET-Tomographen mittlerweile so gute Auflösungswerte, dass die Positronenenergie einen großen Einfluss auf die Auflösung der Aufnahmen hat. Im Fall von  $^{124}\text{I}$  ist die bildliche Auflösung durch die hohe Positronenreichweite im Gewebe ( $E_{\text{max},\beta^+} = 1,5 \text{ MeV}$ , Reichweite $_{\text{max}} = 6,9 \text{ mm}$  und  $E_{\text{max},\beta^+} = 2,1 \text{ MeV}$ , Reichweite $_{\text{max}} = 10,2 \text{ mm}$  in Wasser; im Verhältnis 1:1) im Vergleich mit  $^{18}\text{F}$  ( $E_{\text{max},\beta^+} = 0,6 \text{ MeV}$ , Reichweite $_{\text{max}} = 2,3 \text{ mm}$ ) limitiert [90]. Trotzdem konnte schon die erfolgreiche Anwendung  $^{124}\text{I}$ -markierter Radiotracer gezeigt werden [91, 92].

Die Herstellung von  $^{124}\text{I}$  erfolgt durch Bestrahlung von  $^{124}\text{TeO}_2$  oder  $^{125}\text{TeO}_2$  mit Protonen oder Deuteronen [93]. Die geläufigsten Produktionsrouten sind in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Kernreaktion für die  $^{124}\text{I}$ -Produktion [93]**

Kernreaktion	Projektilenergie [MeV]	Reaktionsausbeute [MBq/ $\mu\text{Ah}$ ]
$^{124}\text{Te}(\text{p},\text{n})^{124}\text{I}$	15 $\rightarrow$ 8	16
$^{124}\text{Te}(\text{d},2\text{n})^{124}\text{I}$	14 $\rightarrow$ 10	22
$^{125}\text{Te}(\text{p},2\text{n})^{124}\text{I}$	21 $\rightarrow$ 15	81

Die Radionuklidreinheit ist stark vom Anreicherungsgrad des verwendeten Targetmaterials aber auch von der Energie der Protonen und Deuteronen abhängig. Bei der früher häufig genutzten Herstellung durch den (d,2n)-Prozess an  $^{124}\text{Te}$ , konnte

eine hohe Kontamination an sehr langlebigem  $^{125}\text{I}$  (60,1 d) festgestellt werden [94, 95]. Durch die Darstellung mittels (p,n)-Prozess aus  $^{124}\text{Te}$  ließen sich die Verunreinigungen an  $^{125}\text{I}$  stark verringern, auch der Anteil an  $^{123}\text{I}$ -Verunreinigungen ist vertretbar [96, 97]. Beide Reaktionen sind an niederenergetischen Zyklotronen durchführbar, führen allerdings zu relativ geringen Ausbeuten. Durch die (p,2n)-Reaktion an  $^{125}\text{Te}$  lässt sich  $^{124}\text{I}$  zwar in sehr hohen Ausbeuten herstellen, allerdings benötigt man ein höherenergetisches Zyklotron [98]. Die Verunreinigungen an  $^{123}\text{I}$  und  $^{125}\text{I}$  entstehen in weitaus höherem Maße als bei den anderen beiden vorgeschlagenen Reaktionen. Die Aufarbeitung der bestrahlten  $\text{TeO}_2$ -Targets erfolgt mittels trockener Destillation. Das erzeugte Radioiod wird entweder direkt in verdünnter NaOH-Lösung aufgefangen oder zuerst in einer Kapillare und dann mit verdünnter NaOH eluiert [88]. Mit der 2. Variante lässt sich ein geringeres Endvolumen erzeugen.

### 1.6.1 Radiofluorierung

Die Einführung von  $^{18}\text{F}$ Fluor in organische Zielverbindungen erfolgt hauptsächlich durch folgende Methoden:

- Elektrophile Substitution
- Nukleophile Substitution

Ist eine Einführung über diese Methoden nicht möglich, kommen häufig prosthetische Gruppen zum Einsatz.

Die **elektrophile Substitution** wird ausgehend von  $^{18}\text{F}\text{F}_2$  oder den daraus herstellbaren, milderen Agenzien  $^{18}\text{F}$ Acetylhypofluorit oder  $^{18}\text{F}$ Xenondifluorid zur Markierung von elektronenreichen Reaktanden, wie z.B. Aromaten eingesetzt [99]. Vorteilhaft wirkt sich hier die Tatsache aus, dass auch Verbindungen markierbar sind, die sonst schwer zugänglich sind. Allerdings muss der Umgang mit gasförmigem elementaren Fluor sehr vorsichtig erfolgen. Des Weiteren können in dieser Reaktion nur maximal 50% Ausbeute erzielt werden, da durchschnittlich bei einem  $^{18}\text{F}\text{F}_2$ -Molekül nur ein radioaktives Fluor-Atom auf das Zielmolekül übertragen wird. Außerdem kommt es aufgrund der hohen Reaktivität des  $^{18}\text{F}\text{F}_2$  zur Bildung vieler Nebenprodukte. Mehrfachfluorierungen, Reaktionen mit dem Lösungsmittel und Bildung von Isomergemischen sind die Folge. Die elektrophile Fluorierung wird hauptsächlich zur Darstellung einiger aromatischer Aminosäuren, wie z.B. 3-O-Methyl-6- $^{18}\text{F}$ fluor-L-Dopa [100], 2- $^{18}\text{F}$ Fluor-L-tyrosin [101] oder 6- $^{18}\text{F}$ Fluor-L-Dopa [102] eingesetzt.

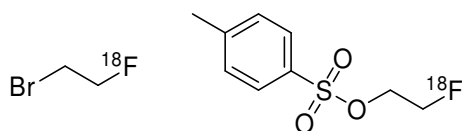
Die **nukleophile Substitution** stellt die wichtigste Methode zur Darstellung radiofluorierter Substanzen dar. Mit dieser Variante ist die trägerarme Synthese von Radiotraceren möglich. Allerdings muss beachtet werden, dass  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$  in wässriger Lösung stark solvatisiert ist und damit unreaktiv vorliegt. Es komplexiert leicht Metallkationen und wird durch azide Protonen sehr schnell zu  $[^{18}\text{F}]\text{HF}$  protoniert. Die Reaktion erfolgt daher nur in dipolaren, aprotischen und wasserfreien Lösungsmitteln wie z.B. Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Sulfolan oder Dimethylformamid. Um die Löslichkeit des Fluorids zu fördern, werden Tetraalkylammoniumcarbonate und -hydroxide als Phasentransferkatalysatoren, sowie Aminopolyether wie Kryptofix  $\text{K}_{2.2.2}^{\text{®}}$  und Hilfsbasen mit nicht nukleophilem Anion wie Kalium- oder Cäsiumcarbonat oder Kaliumoxalat zugesetzt. Eine mit  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  direkt zu substituierende Position in der Markierungsvorstufe muss hinreichend aktiviert und mit einer guten Abgangsgruppe versehen sein.

Für die nukleophile Substitution an Aliphaten, einer einfachen  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion, werden Halogene oder Sulfonsäureester als Abgangsgruppen eingesetzt, um die Reaktionsausbeute zu maximieren. Einstufige Markierungssynthesen an aromatischen Strukturen verlaufen meist ebenfalls über den direkten nukleophilen Austausch ( $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -Reaktionen) einer guten Abgangsgruppe ( $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{NMe}_3^+$ ) gegen  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ . Hier muss allerdings häufig die Markierungsvorstufe durch elektronenziehende Substituenten, wie Nitro-, Cyano- bzw. Acylsubstituenten, in ortho- und para-Stellung zur Position des Austauschs ausreichend aktiviert sein. Als Gegenionen der Trimethylammoniumabgangsgruppe eignen sich Iodid, Tosylat oder auch Triflat [103]. Bei komplexen Strukturen ergeben sich oft Probleme während der Synthese, da sensitive Markierungsvorstufen und Produkte die stark basischen Bedingungen und oft hohen Temperaturen ( $>100^\circ\text{C}$ ) nicht vertragen und es zur Zersetzung kommt.

Um diese Problematik zu umgehen, wird  $^{18}\text{F}$  zunächst an kleine Synthesebausteine gekoppelt, die dann in das Produkt eingebaut werden. Diese Synthesebausteine werden auch als **prosthetische Gruppen** bezeichnet und sind oft selbst über direkte nukleophile Radiofluorierungen mit  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  zugänglich. Ihr bifunktionaler Aufbau ermöglicht die Synthese der Radiotracer unter weitaus mildereren Bedingungen als durch Direktfluorierung. In der Literatur werden viele Beispiele genannt, die diese Markierungsstrategie über Alkylierungen [104, 105], Acylierungen [106-110], Amidierungen [111] und Thioetherbildung [116-119] verfolgen.

Bei der Fluoralkylierung werden bifunktionelle Alkane, mit  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$  umgesetzt (Abbildung 17) und anschließend an H-acide Verbindungen, wie Amine, Alkohole und Thiole, gekoppelt [112].

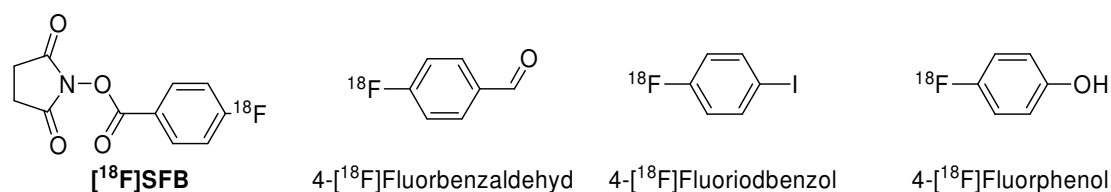




**Abbildung 17: Prosthetische Gruppen für die Fluoralkylierung**  
 $[^{18}\text{F}]$ Bromfluorethan (links),  $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat (rechts)

Die  $^{18}\text{F}$ -Fluoralkylierung ist eine sehr häufig genutzte Möglichkeit zur Radiomarkierung von PET-Radiotracer. Sie ist seit den 80er Jahren, als z.B. Chi et al. und Block et al., die ersten prosthetischen Gruppen zur Fluoralkylierung vorstellten [104, 105, 113], bekannt. Eine große Anzahl verschiedenster Fluoralkylierungsreagenzien, wie  $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat ( $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ ) [104, 114, 115],  $[^{18}\text{F}]$ Bromfluorethan ( $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$ ) [115-117],  $[^{18}\text{F}]$ Bromfluormethan [118, 119],  $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltriflat ( $[^{18}\text{F}]\text{FETf}$ ) [120, 121],  $[^{18}\text{F}]$ Bromfluorpropan [122, 123] und  $[^{18}\text{F}]$ Fluoriodpropan [123, 124] wurde bereits in der Literatur vorgestellt und für die Radiomarkierung eingesetzt. Dabei wird eine möglichst kurze Kohlenstoffkette häufig bevorzugt, da somit nur geringe strukturelle Änderungen ins Zielmolekül eingefügt werden. Zur Zeit werden routinemäßig zwei in der klinischen Medizin genutzte Radiotracer über  $[^{18}\text{F}]$ Fluoralkylierung hergestellt [115]: *O*-(2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyl)-L-tyrosin [114, 125] und 2 $\beta$ -Carbomethoxy-3 $\beta$ -(4-iodphenyl)-8-(3- $[^{18}\text{F}]$ fluorpropyl)nortropine [126, 127]. Die eingeführte  $[^{18}\text{F}]$ Fluorethylgruppe ist in ihrer Funktion sowie ihren sterischen und elektronischen Eigenschaften mit einer Methyl- oder auch Ethylgruppe vergleichbar [115].

Sowohl die Fluoracylierung als auch die Fluoramidierung werden häufig zur Markierung von Peptiden und Proteinen eingesetzt, da sie die Umsetzung im wässrigen Medium bei niedrigen Temperaturen ermöglichen. Es werden in  $\beta$ -Position markierte Aktivester mit Aminen, Thiolen und Alkoholen zur Reaktion gebracht. Prosthetische Gruppen, wie  $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$  (*N*-Succinimidyl-4- $[^{18}\text{F}]$ fluorbenzoat, Abbildung 18) zeichnen sich durch ein breites Anwendungsspektrum bei der Markierung von Peptiden und Proteinen aus [108, 109]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, komplexe chemische Strukturen, die über eine direkte nukleophile Fluorierung nicht darstellbar sind, mehrstufig unter Verwendung prosthetischer Gruppen zu synthetisieren. So lassen sich z.B. Neben- und Zersetzungsreaktion durch den Einsatz geringerer Temperaturen und milderer Bedingungen vermeiden.



**Abbildung 18: Ausgewählte prosthetische Gruppen für die Fluorarylierung**

So ermöglichen Strukturen wie 4-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorbenzaldehyd [128], [ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-4-iodbenzol [129, 130] und andere [ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-4-haloderivate [131] sowie [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorphenol die Fluorarylierung an deaktivierten Systemen (Abbildung 18) über verschiedenste Reaktionen, wie z.B. Sonogashira- [129], Suzuki- [130] oder Horner-Wadsworth-Emmons Kupplungen [128]. Mit den diversen prosthetischen Gruppen steht dem Radiochemiker ein großes Arsenal an Möglichkeiten zur Verfügung, um verschiedenste radiomarkierte Verbindungen in guten Ausbeuten und hoher spezifischer Aktivität darzustellen.

### 1.6.2 Radioiodierung

Es bestehen zwei Hauptmöglichkeiten der Inkorporation von Radioiod in ein organisches Molekül [88, 132]:

- Elektrophile Substitution
- Nukleophile Substitution

Für die Anwendung radioiodierter Verbindungen ist eine stabile C-I Bindung notwendig, wie sie z.B. in aromatischen und vinyllischen Verbindungen zu finden ist. Dadurch ermöglichen sie eine hohe chemische und *in vivo*-Stabilität der radiomarkierten Verbindungen. Aliphatische Verbindungen spielen aufgrund der geringeren Stabilität eine eher untergeordnete Rolle für die Anwendung [88].

Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Inkorporation des Radioiods erfolgt daher durch **elektrophile Substitution am Aromaten** (Abbildung 19) mit einem Proton als Abgangsgruppe oder durch Demetallierung, da sie sehr einfach durchgeführt werden kann und hohe Ausbeuten liefert. Eine positiv geladene Iodspezies greift dabei ein elektronenreiches System wie einen aromatischen Ring oder eine Doppelbindung an und es entsteht eine stabile C-I Bindung, wobei eine positiv geladene Abgangsgruppe vom Molekül abgegeben wird.

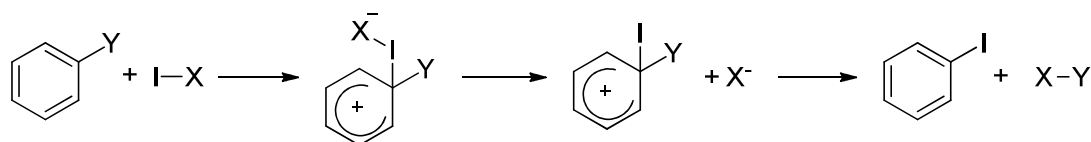


Abbildung 19: Mechanismus der elektrophilen Substitution am Aromat [88]

Bei der direkten Variante wird ein Wasserstoffatom des aktivierten Aromaten (Phenole, Anisole, usw.) gegen das Radioiod ausgetauscht. Dabei kommt es allerdings vermehrt zur Bildung von Nebenprodukten, da die Einführung nicht regioselektiv erfolgt. Die

Substitution folgt den bekannten Regeln basierend auf induktiven und mesomeren Effekten. Elektronenschiebende Gruppen wirken meist ortho- und para-dirigierend.

Metallorganische Verbindungen, vorwiegend mit Metallen der IV. Hauptgruppe des Periodensystems, bilden geeignete Derivate für die regioselektive Darstellung radioiodierter Verbindungen unter sehr milden Bedingungen [133]. Die Kohlenstoff-Metall (C-M)-Bindung wird durch den elektropositiven Charakter der Metalle polarisiert und somit für den elektrophilen Angriff aktiviert. Die Reaktionen benötigen nur sehr wenig Zeit und liefern sehr hohe Ausbeuten, da die C-M-Bindung sehr instabil ist. Allerdings wird eine organometallalkylierte Markierungsvorstufe benötigt, die meist sehr aufwendig darzustellen ist. Der Einsatz von Zinnorganyl-Abgangsgruppen, wie Trimethylstannyl- und Tributylstannyl-, ist sehr weit verbreitet. Es finden sich aber auch Publikationen über den Einsatz anderer Metalle der IV. Hauptgruppe sowie von Bor-, Quecksilber- und Thalliumverbindungen [88, 134, 135].

Borone eignen sich sehr gut für die Demetallierung, da die Iodierung unter basischen Bedingungen stattfinden kann. Die Radioiodierung unter basischen Bedingungen ist gegenüber einer Darstellung in neutralen oder sauren Medien zu bevorzugen. Unter diesen Bedingungen entsteht kein elementares und somit flüchtiges Iod und der Strahlenschutz ist besser zu gewährleisten. Die Markierungsvorstufen sind meist kristallin und stabil gegenüber Luft und Feuchtigkeit [88, 134]. Radioiodierung mit Organometallderivaten der IV. Hauptgruppe laufen mit sehr hohen radiochemischen Reinheiten und hohen spezifischen Aktivitäten ab, allen voran der Umsatz von Trimethylstannylderivaten in Eisessig oder Methanol.

Das geringe Oxidationspotential für Iod ( $I^- \leftrightarrow \frac{1}{2} I_2 + e^-$ ;  $\epsilon_0 = 0,5355$ ) ermöglicht eine direkte Bildung von  $I^+$  *in situ* unter Verwendung verschiedener Oxidationsmittel [88]. Für die elektrophile Substitution mit Radioiod haben sich mehrere Oxidationsmittel als sinnvoll erwiesen, wie z.B. Natriumiodat zur sanften Oxidation bei der Radioiodierung empfindlicher Substanzen (z.B. Proteine). Ebenso findet Wasserstoffperoxid in Eisessig Anwendung, welcher *in situ* Peressigsäure bildet und somit oxidierend wirkt [88, 135]. Eine enzymatische Oxidation zur Radioiodierung von sehr empfindlichen Molekülen erlaubt die Verwendung von Lactoperoxidase, allerdings kommt es häufig zu Nebenprodukten durch eine Selbstiodierung des Enzyms [88, 135]. Wesentlich häufiger setzt man allerdings Chloramin T (CAT) und Iodogen<sup>TM</sup> ein (Abbildung 20).

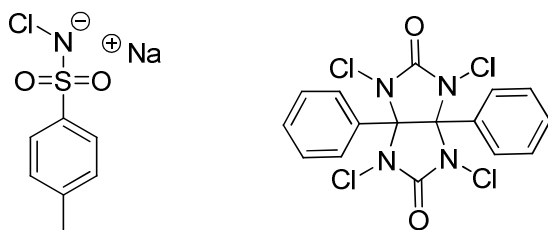


Abbildung 20: Strukturformeln von Chloramin T (links) und Iodogen™ (rechts)

CAT, ein *N*-chloriertes *p*-Toluolsulfonsäureamid, bildet eine oxidative Spezies über Interhalogenverbindungen mit Hypochlorit [136]. Aufgrund der starken Oxidationsbedingungen entstehen chlorierte Nebenprodukte. Um dies möglichst zu verhindern, erfolgt der Einsatz geringster Mengen CAT [92, 143, 145]. Iodobeads™, d.h. polymergebundenes CAT, erleichtern die Radioiodierung, da diese nach der Synthese nur dem Reaktionsgemisch entnommen werden müssen, eine Reduktion ist nicht nötig. Des Weiteren verläuft die Oxidation schonender, da die Reaktion an der Phasengrenze abläuft. [135, 137] CAT findet auch Einsatz bei der Radiobromierung. Iodogen™, 1,3,4,6-Tetrachlor-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycouril trägt 4 *N*-Chlorgruppen und eignet sich zur schonenden Radioiodierung von Proteinen und Peptiden [138]. Iodogen™ ist nicht wasserlöslich und wird häufig als dünner Film auf der Innenwand des Reaktionsgefäßes für die Synthese eingesetzt. Somit findet auch hier die Oxidation an der Phasengrenze statt [132, 138]. Die Ausbeuten und Reinheiten sind vergleichbar mit der CAT-Methode [132, 135, 138], allerdings kommt es bei der Verwendung von Iodogen auch zur Selbstiodierung des Oxidationsmittels [139].

Die Radioiodierung kann auch über eine **nukleophile Substitution** erfolgen. Oft geschieht diese Reaktion durch Isotopen oder Nichtisotopen (Brom gegen Radioiod) Halogenaustausch. Bei der Radioioddeiodierung sind große Mengen Markierungsvorstufe nötig und dadurch ist die entstehende spezifische Aktivität sehr gering. Bei der Radioioddebromierung können zwar n.c.a.-Synthesen durchgeführt werden, die Abtrennung der Markierungsvorstufe gestaltet sich allerdings schwierig. Beide Reaktionstypen benötigen viel Energie und damit verbunden hohe Reaktionstemperaturen. Diese drastischen Reaktionsbedingungen führen sehr häufig zur Zersetzung des Produktes oder der Markierungsvorstufe [88, 140]. Bei der Reaktion unter Kupfer(I)-Katalyse kann ein Brom-Radioiod-Austausch unter milderen Bedingungen (ca. 140 °C, 30 min) durchgeführt werden. Dabei wirkt das Kupfer(I) in einem Übergangskomplex elektronenziehend auf die Abgangsgruppe und ermöglicht so den nukleophilen Angriff des Radioiods [141]. Unter diesen Bedingungen können trägerarm hohe chemische Ausbeuten erzielt werden.

## **2. Zielstellung der Arbeit**

Im Rahmen der Promotion sollen die Möglichkeiten der molekularen Bildgebung zellzyklusrelevanter Kinasen für die Tumorcharakterisierung untersucht werden. Die Entwicklung von radioaktiv markierten Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen 4/6 (Cdk) als Radiotracer und ihre radiopharmakologische Charakterisierung stellt dabei einen neuen Ansatz dar.

Mit den einzigartigen Möglichkeiten der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) als modernes bildgebendes Verfahren der Medizin und Forschung zur quantitativen Beschreibung und dreidimensionalen Darstellung von Stoffwechselvorgängen im intakten Organismus kann die Rolle der Cdk in Tumoren auf molekularer Ebene beschrieben und für die funktionelle Tumordiagnose genutzt werden. Dazu sollen verschiedene radioaktiv markierte Cdk-Inhibitoren als PET-Radiotracer eingesetzt werden. Bisher sind exakte Angaben über Cdk-Proteingehalte und deren Aktivität in Tumoren und anderen Geweben nur durch sehr aufwendige *ex vivo*-Analysen zugänglich. Die nicht-invasive Beobachtung der Cdk4/6 *in vivo* mittels PET gäbe die Möglichkeit, die Proteinexpression und Aktivität während der Tumorigenese genau zu bestimmen. Diese pharmakologischen Daten würden helfen, die physiologischen Prozesse und metabolischen Wege der Cdk4/6 aufzuklären.

Um die Rolle der Cdk4/6 im Zellzyklus von gesunden und deregulierten (z.B. Tumor-) Zellen aufzuklären, ist es nötig, Inhibitoren einzusetzen, die hochselektiv diese Cdk blockieren. Diese Substanzen sollen mit den Positronenstrahlern  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 109,8 \text{ min}$ ) und  $^{124}\text{I}$  ( $t_{1/2} = 4,1 \text{ d}$ ) markiert werden.

Für die vorliegende Promotion lassen sich drei Hypothesen aufstellen:

- Die in der Literatur vorgestellte Klasse der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine zur Inhibierung von Cdk4/6 lässt sich mit den beiden Positronen-emittierenden Nukliden  $^{124}\text{I}$  und  $^{18}\text{F}$  radioaktiv markieren (vgl 1.4).
- Die Entwicklung und *in vitro*-/*in vivo*-Untersuchung von radiomarkierten Cdk4/6 Inhibitoren hilft den Metabolismus der Cdk4/6 *in vivo* aufzuklären.
- Radiomarkierte Cdk4/6-Inhibitoren mit Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Grundgerüst stellen eine neue vielversprechende Klasse von PET-Radiotracern für die Charakterisierung von Tumoren dar.

Daraus ergeben sich für diese Arbeit drei Schwerpunkte:

- ***Synthese und Charakterisierung geeigneter Pyrido[2,3-d]pyrimidine als Inhibitoren der Cdk4/6***

Die Arbeiten beginnen mit der Auswahl geeigneter Strukturen für die Synthese radiomarkierter Inhibitoren. Die Synthesen der Markierungsvorstufen bauen auf bereits in der Literatur vorgestellte Wege auf. An die Synthese der Markierungsvorstufe schließt sich die Darstellung der nicht-radioaktiven Referenzsubstanzen an. Die Referenzsubstanzen werden auf ihre Wirkung auf Zellen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie untersucht, um herauszufinden, ob die Verbindungen ausreichend potent sind und sich für die weiteren geplanten biologischen und radiopharmakologischen Untersuchungen eignen.

- ***Durchführung von Radiomarkierungen der Strukturen mit den Positronen-emittierenden Nukliden  $^{18}\text{F}$  und  $^{124}\text{I}$***

Zunächst muss eine geeignete Markierungsstrategie entwickelt werden und anschließend die radioaktive Markierung der Markierungsvorstufen unter Variation geeigneter Reaktionsparameter, wie z. B. Oxidationsmittel, pH-Wert, Konzentration der Markierungsvorstufe, Reaktionstemperatur und Reaktionsdauer, optimiert werden. Die radioaktiven Inhibitoren werden dann für die radiopharmakologischen Untersuchungen bereitgestellt.

- ***Radiopharmakologische Bewertung ausgewählter radiomarkierter Verbindungen***

Es sollen die Eigenschaften der radioaktiven Substanzen in *in vitro*-Zellaufnahme- sowie *in vitro*-, *in vivo*- und *ex vivo*- Stabilitätsstudien und *in vivo*-Bioverteilungsuntersuchungen ermittelt und miteinander verglichen werden und die radiomarkierten Verbindungen hinsichtlich ihrer Eignung als Radiotracer bewertet werden. Dieser Teil der Arbeit erfolgt in enger Kooperation der Abteilungen „Radiopharmazeutische Biologie“ und „PET-Tracer“ des Instituts für Radiopharmazie.

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellen das Design, die Synthese und die Radiomarkierung der Inhibitoren der Cdk4/6 sowie erste radiopharmakologische Untersuchungen dar. Die ausführliche biologische und radiopharmakologische Charakterisierung der Verbindungen ist Bestandteil der Promotionsarbeit von Frau DC Franziska Graf [142] am selben Institut.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Syntheseplanung

Die darzustellenden Referenzsubstanzen und Markierungsvorstufen zeigt Abbildung 21. Die Verbindung **CKIA** stellt dabei eine von VanderWel *et al.*, [13] vorgestellte Verbindung (Nr. 30 in der Literatur) dar.

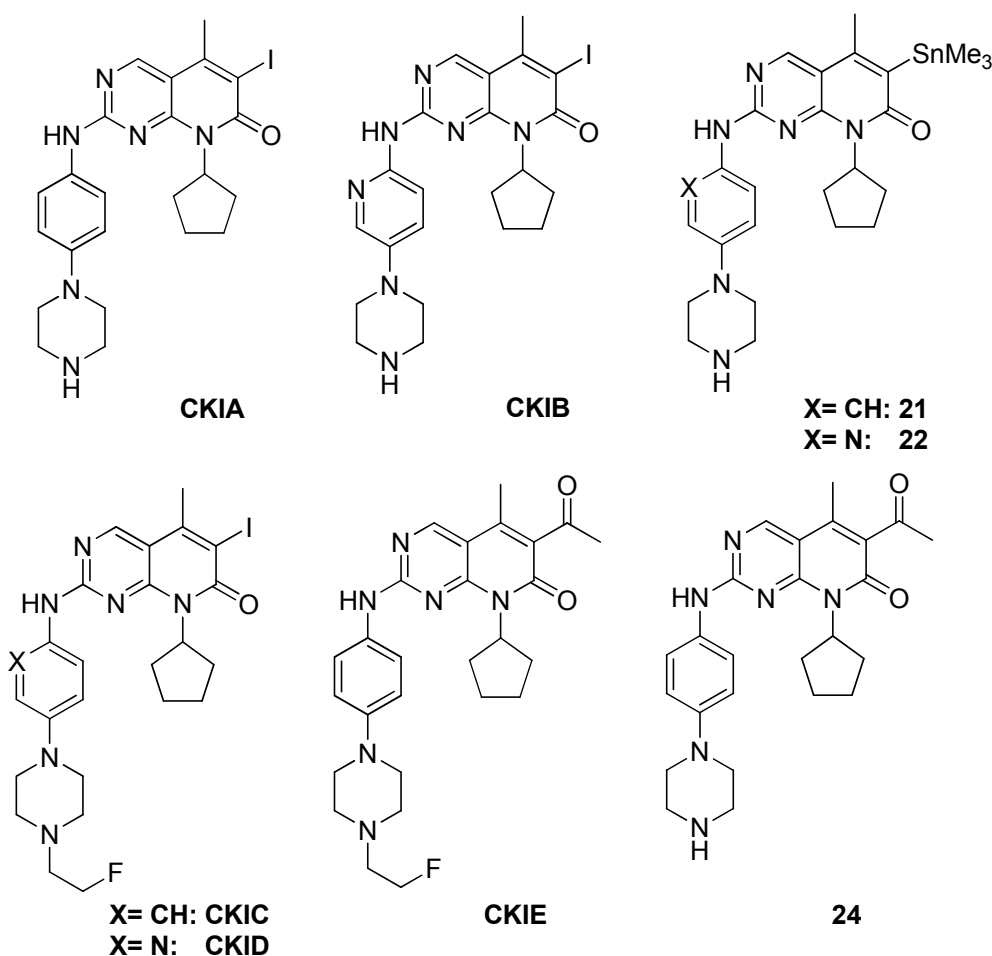
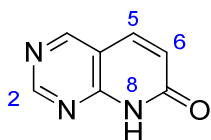


Abbildung 21: Darzustellende mögliche Inhibitoren und Markierungsvorstufen

Diese Verbindung zeigt einen sehr geringen  $IC_{50}$  Wert (5 nM, vgl. 1.4 Tabelle 4) gegenüber Cdk4/CykD und eine gute Selektivität im Vergleich zu den anderen Cdk/Cyk-Komplexen.

Das Molekül eignet sich für eine isotope Radiomarkierung, der Ersatz des natürlichen Iodisotops durch  $^{124}I$  sollte sich über Radioioddestannylierung realisieren lassen und würde so den Einbau eines PET-Radionuklids erlauben. Die dafür notwendige

Markierungsvorstufe wird an der entsprechenden Position mit einer Trimethylstannylabgangsgruppe (**21/22**) versehen.



**Abbildung 22: Leitstruktur der Derivate für die Cdk4/6 Inhibitor-Entwicklung**

In blau die Bezeichnung der Atome.

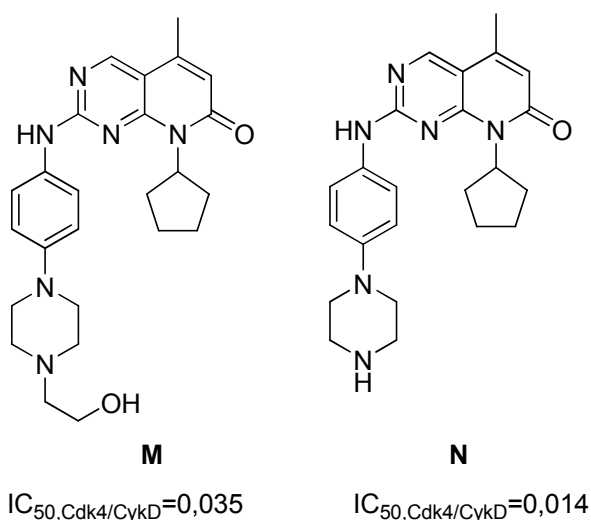
Aufbauend auf diese Struktur sollten noch weitere Verbindungen charakterisiert werden. Da aus der Literatur bekannt ist, dass eine Aminopyridinseitenkette (5-(Piperazin-1-yl)pyridin-2-amin) an Position 2 (Abbildung 22) einen Anstieg der Selektivität der Verbindung für Cdk4/CykD gegenüber Cdk2/CykA mit sich bringt [12], ist es sinnvoll die neue Verbindung **CKIB** ebenfalls herzustellen und pharmakologisch sowie radiopharmakologisch zu untersuchen. Da die Bildgebung mit  $^{124}\text{I}$  aufgrund des geringen Positronenanteils (22%) und des komplexen Zerfallsschema mit mehreren  $\gamma$ -Linien [89] erschwert ist, empfiehlt es sich auch Verbindungen mit dem Radionuklid  $^{18}\text{F}$  zu synthetisieren. Die Synthese einer Markierungsvorstufe, die sich über nukleophile aromatische Substitution direkt mit  $^{18}\text{F}$  Fluorid markieren lässt, ist durch die vorgegebene Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinstruktur nicht möglich. Im vorliegenden Pyrido[2,3-*d*]pyrimidinring stehen keine aktivierten Positionen für den nukleophilen Angriff zur Verfügung und die Anilin- bzw. Pyridinseitenkette ist für den nukleophilen Angriff deaktiviert. Eine aromatische C-F Bindung ist einer aliphatischen zwar aufgrund ihrer erhöhten *in vivo*-Stabilität vorzuziehen, allerdings im Fall dieser Leitstruktur nicht zu realisieren. Da die elektrophile Substitution aufgrund der geringen maximalen spezifischen Aktivität nicht in Frage kommt, sollte die Markierung über prosthetische Gruppen erfolgen.

Um die Leitstruktur nur minimal zu verändern, wurde die Fluorethylierung am sekundären Amin der Seitenkette gewählt.

VanderWel *et al.* stellten 2005 die Verbindung **M** (Abbildung 23) vor, die an diesem para-Piperazin-Stickstoff eine Hydroxyethylierung aufweist. Diese Verbindung zeigt im Vergleich zur Verbindung **N** (Abbildung 23) mit unsubstituiertem Amin eine leicht verschlechterte inhibitorische Wirkung. Davon ausgehend, dass sich dieses Verhältnis auf die an Position 6 iodierten Verbindungen übertragen lässt, sollte eine Veränderung an dieser Position der Seitenkette keinen großen Einfluss auf das Inhibitorpotential haben. Die Verbindungen **CKIC/D** stellen somit eine einfach realisierbare Möglichkeit dar,  $^{18}\text{F}$  Fluorid für die Radiomarkierung der Cdk4-Inhibitoren ohne wesentliche



Veränderungen des Moleküls nutzbar zu machen. Eine isotope Radiomarkierung ist hier nicht möglich, das PET-Radionuklid Sauerstoff-15 weist mit einer Halbwertszeit von 2 min eine zu geringe Zeitspanne für die Synthese der prosthetischen Gruppe und deren anschließende Anbindung an die Markierungsvorstufe auf. Die Hydroxylgruppe lässt sich durch ein Fluor-Atom ersetzen, da sich die Eigenschaften der C-O und der C-F Bindung ähneln. Allerdings verändert Fluor mit einer Elektronegativität von 4,0 im Vergleich zu Sauerstoff mit 3,5 die Polarität des Moleküls, und beeinflusst das *in vivo*-Verhalten. Dieser Einfluss muss bei der biologischen Betrachtung berücksichtigt werden.



**Abbildung 23: Direkter Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte einer unsubstituierten Verbindung N mit einer an der Seitenkette hydroxyethylierten Verbindung M [13]**

Bei der Entwicklung von Radiotraceren spielt die Lipophilie einer Verbindung eine große Rolle, da sie die Verteilung des Radiotracers im Körper entscheidend beeinflusst. Die Lipophilie ermöglicht zudem eine Aussage bezüglich möglicher Ausscheidungswege und der Proteinbindung einer Substanz. Modellberechnungen für die Verbindungen **CKIA-CKID** zeigten, dass die Einführung des Fluorethylrests die Lipophilie der Verbindung **CKIC** und **CKID** um 0,56 (berechnet mit Chem Draw, vgl. 6.2.9) bzw 0,89 (berechnet mit Molinspiration, vgl. 6.2.9) im Vergleich zu **CKIA** und **CKIB** anhebt, d.h. dass sich die Anreicherungswahrscheinlichkeit der Verbindung in der organischen Phase um Faktor 3-7 erhöht. Da die berechneten Werte für die Verbindungen **CKIA/B** schon recht hoch liegen, ist anzunehmen, dass die Lipophile der Verbindungen **CKIC/D** für eine radiopharmakologische Untersuchung zu hoch ist. Um trotzdem über eine fluoridierte Verbindung mit ähnlicher Lipophilie wie die Verbindungen **CKIA/B** zu verfügen, muss das Molekül insofern verändert werden, dass eine die Lipophilie senkende funktionelle Gruppe eingeführt wird. Im Fall dieser iodtragenden

Verbindungen ist ein Austausch des Iods gegen eine andere, hydrophilere funktionelle Gruppe ratsam. Sauerstofftragende Gruppen wie Alkohole, Carbonsäuren und deren Ester sowie Ketone können dafür eingesetzt werden. Aus der Literatur [13] geht hervor, dass v.a. Methylketone in Position 6 sehr geringe  $IC_{50}$ -Werte gegenüber Cdk4/CykD und eine ausreichend hohe Selektivität gegenüber den anderen Cdk/Cyk-Komplexen aufweisen. Die Verbindung **CKIE** zeigt aufgrund der Kombination aus Fluorethylierung der Seitenketten und dem Methylketon in C6-Position eine vergleichbare Lipophilie wie **CKIA/B**.

In den biologischen und radiopharmakologischen Untersuchungen muss nun geklärt werden, ob die inhibitorische Wirkung und Selektivität der Verbindungen eine Tumorcharakterisierung ermöglichen.

### 3.2 Synthese der Markierungsvorstufen und deren Referenzen

Die Darstellung der Markierungsvorstufen und Referenzsubstanzen orientiert sich an der von VanderWel *et al.* [13] vorgestellten Syntheseroute zur Verbindung **CKIA**. Ausgehend von 4-Chlor-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-carbonsäure-ethylester können die beiden Grundgerüste in einer acht- bzw. neun-stufigen Syntheseroute dargestellt werden (Abbildung 24).

Die Darstellungsrouten beginnt mit der Einführung der Aminocyclopentylgruppe in einer nukleophilen Substitution und anschließender Reduktion des Ethylesters mit Lithiumaluminiumhydrid zum primären Alkohol **12** und Oxidation mit Mangan(IV)oxid zum Aldehyd **13**, um das Molekül für die Einführung der Methylgruppe im 4. Schritt zu aktivieren. Die Einführung der Methylgruppe geschieht dann mittels Umsetzung mit Methylmagnesiumbromid in einer Grignard-Reaktion. Für den Ringschluss zum Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin **16** über eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit anschließender Amidbildung bei Zugabe von HCl muss der sekundäre Alkohol **14** vorher durch Oxidation zum Keton **15** aktiviert werden. Daraufhin erfolgt die Einführung des Iods in Position 6. Ausgehend von Verbindung **17** lässt sich das Methylketon **18** aus der iodierten Verbindung **17** in einer Stille-Kupplung darstellen. Die Aktivierung der Thioether **17** und **18** für die Kupplung der Seitenketten in Position 2 erfolgt durch Oxidation mit Oxaziridin zu den entsprechenden Sulfoxiden **19** und **20**. Diese funktionelle Gruppe lässt sich in einer nukleophilen Substitutionsreaktion am Aromaten durch das primäre Amin der Seitenketten verdrängen.

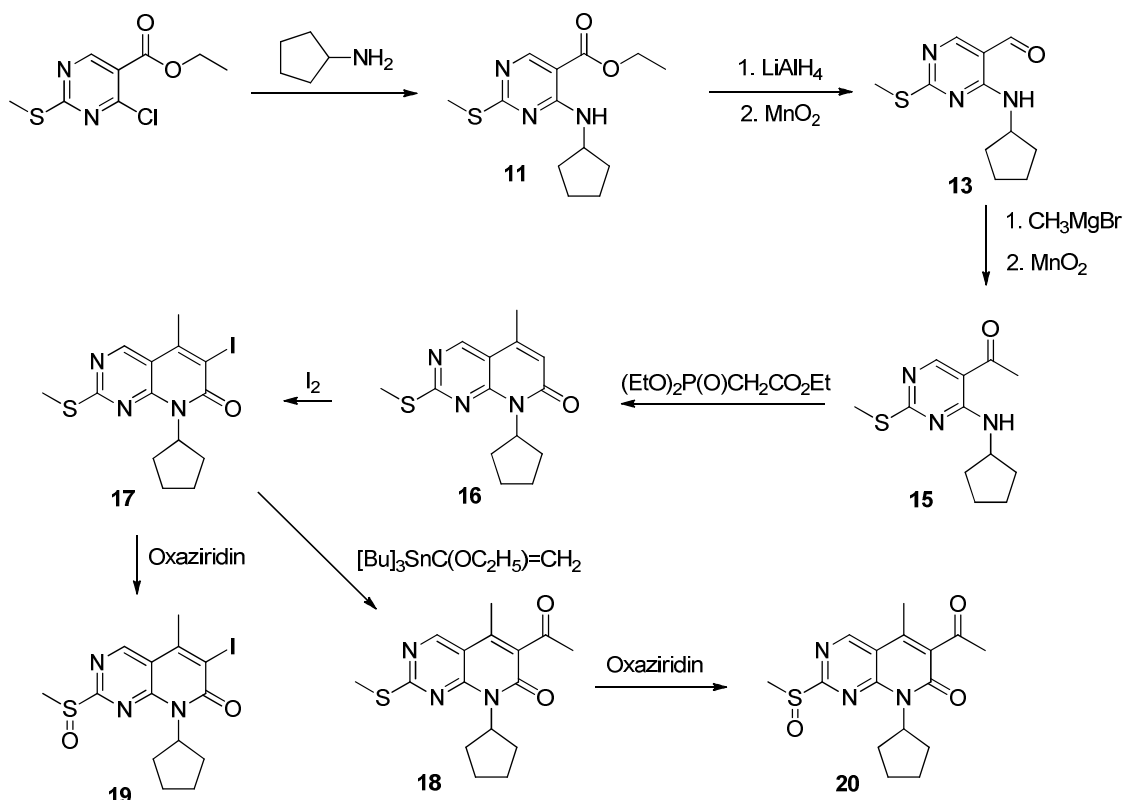
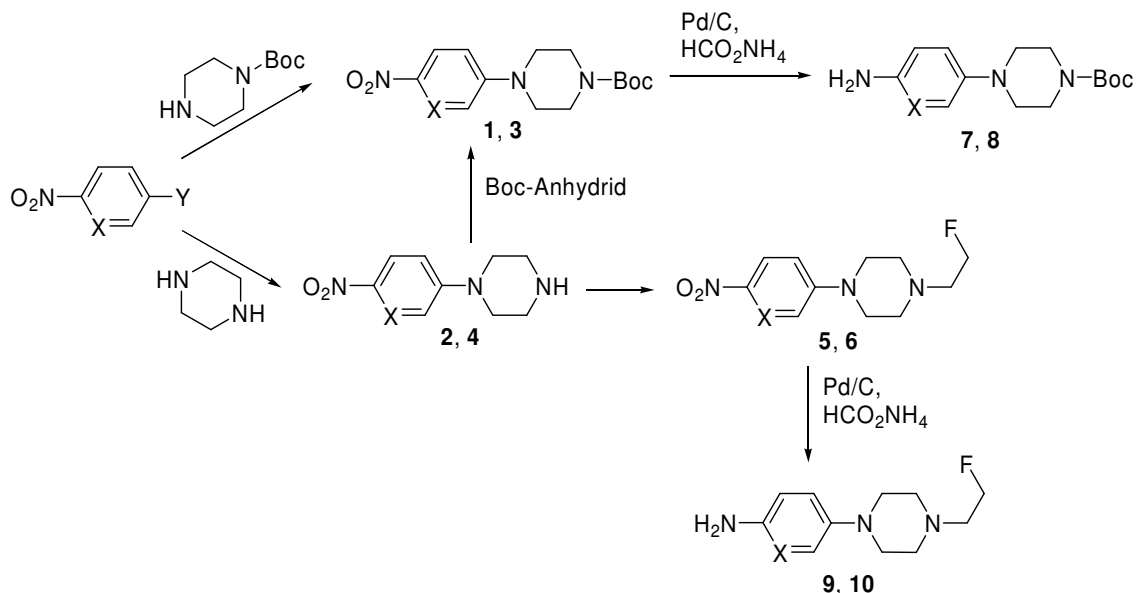


Abbildung 24: Genereller Syntheseweg zur Darstellung der Grundgerüste 19 und 20

Die Synthese der Seitenketten erfolgt nach der Literatur von VanderWel *et al.* sowie Toogood *et al.* [12, 13] (Abbildung 25).

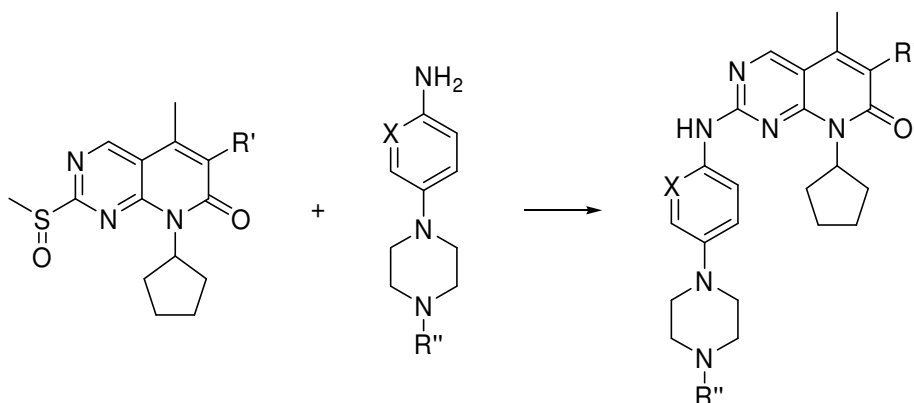


1, 4, 5, 7, 9 (X=CH, Y = F); 2, 3, 6, 8, 10 (X = N, Y = Br)

Die Darstellung der Seitenketten 7 und 9 sowie der Seitenketten 8 und 10 aus 1-Nitro-4-fluorbenzen bzw. 5-Brom-2-nitropyridin erfolgt durch nukleophile Substitution

des Fluoratoms mit 1-Boc-Piperazin und anschließender Reduktion der Nitrofunktion zu den Aminen. Für die Darstellung der fluorierten Referenzsubstanzen bietet es sich an, direkt die Seitenkette zu fluorethylieren.

Die Kupplung der Seitenkette an das Grundgerüst (Abbildung 26) erfolgt ebenfalls nach Literaturvorschrift [12, 13].



**Abbildung 26: Kupplung der Seitenketten an die Grundgerüste**

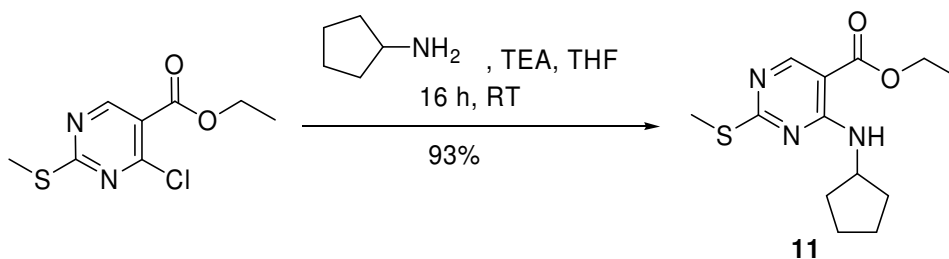
X = N oder CH, R' = I oder -COMe, R'' = -Fluorethyl oder -Boc

Von diesen Leitstrukturen lassen sich dann alle Markierungsvorstufen und Referenzen ableiten.

### 3.2.1 Synthese der Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Grundgerüste

#### Darstellung des 4-Cyclopentylamin-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-carbonsäure-ethylesters (11)

Die Synthese der an Position 2 iodierten bzw. mit einem Methylketon versehenen Grundgerüste begann mit der Darstellung von **11** aus 4-Chloro-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-carbonsäure-ethylester (Abbildung 27). Dabei wurde nach der literaturbekannten Synthesevorschrift verfahren, die von einer Umsetzung mit Cyclopentylamin in Tetrahydrofuran (THF) ausgeht. Um das entstehende HCl abzufangen, wurde Triethylamin (TEA) als Base zugesetzt.



**Abbildung 27: Darstellung von 11**

Die Reinigung des Reaktionsgemischs erfolgte durch Abfiltrieren des entstehenden Niederschlags. Die Ausbeute der Reaktion betrug 93% und die erhaltenen analytischen Daten (MS, NMR) stimmen mit den Literaturangaben [13] überein.

### Darstellung von 4-Cyclopentylamin-2-methylsulfanylpirimidin-5-yl-methanol (**12**)

An die Darstellung von **11** schließt sich die Umsetzung zu **12** (Abbildung 28) an, da Bavarian *et al.* feststellen konnten, dass die Reduktion des Esters zum primären Alkohol mit anschließender Oxidation zum korrespondierenden Aldehyd verlässlicher und mit besseren Ausbeuten verläuft als die entsprechende direkte Reduktion vom Ester zum Aldehyd [8].

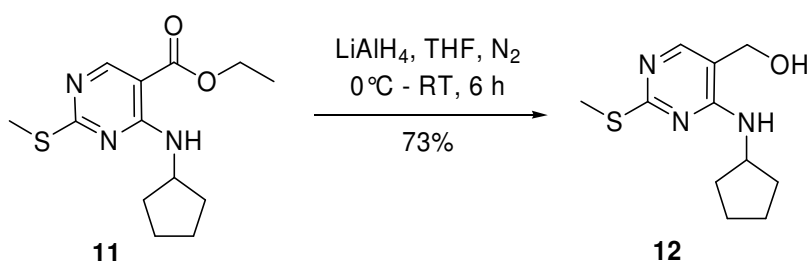


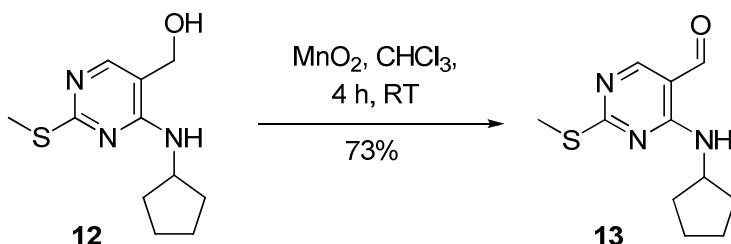
Abbildung 28: Darstellung von **12**

Die Reaktion verläuft unter Standardbedingungen mit einem Überschuss an  $\text{LiAlH}_4$ , um eine vollständige Reduktion gewährleisten zu können. Das verwendete THF wurde vor der Reaktion über Natrium unter Rückfluss gekocht und anschließend destilliert. Das Reaktionsgemisch wurde mittels Eisbad gekühlt und das  $\text{LiAlH}_4$  in kleinen Portionen über einen Tropftrichter zugegeben, um der starken Temperaturentwicklung entgegenzuwirken und damit die Temperatur des Gemischs stets unter  $20^\circ\text{C}$  zu halten. Eine Verwendung von 2,3 M  $\text{LiAlH}_4$ -Suspension in THF zeigte vergleichbare Ausbeuten wie die Verwendung einer 3,5 M Suspension im Diethylether/THF-Gemisch. Überschüssiges  $\text{LiAlH}_4$  wurde durch Zugabe von 1,0 M NaOH-Lösung gequenchet und die entstandenen Hydroxide abfiltriert. Das Produkt kann nach der Reinigung durch Extraktion mit Ethylacetat und Umkristallisation aus Petrolether  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

### Darstellung von 4-Cyclopentylamino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl-carbaldehyd (**13**)

Die Oxidation von **12** zu **13** erfolgte durch Umsetzung mit einem zehnfachen Überschuss an aktiviertem Mangan(IV)oxid (Abbildung 29). Braunstein eignet sich vor allem für die Oxidation allylischer und benzyllischer Hydroxyl-Gruppen, und weist für diese funktionellen Gruppen eine gewisse Selektivität auf. Aktives Mangandioxid wird

durch Komproportionierungsreaktionen von Mangan(II)sulfat mit Kaliumpermanganat in Natriumhydroxid erhalten. Die Reaktivität hängt vom Herstellungsverfahren und Wassergehalt ab.

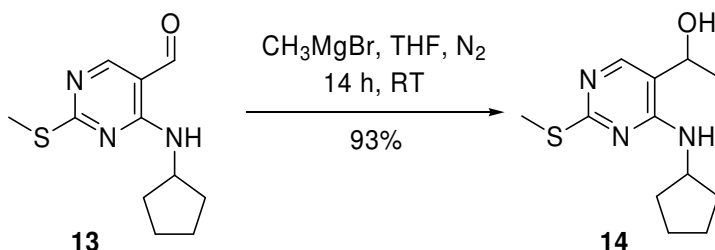


**Abbildung 29: Darstellung von 13**

Die Oxidation verläuft bei Raumtemperatur, das Produkt wird nach der Umsetzung durch Filtration vom Braunstein abgetrennt. Um eine quantitative Abtrennung zu erreichen, wird Celite, bzw. Kieselgur als Filtrierhilfsmittel eingesetzt. Da der verwendete Braunstein sehr feinpulvrig ist, verstopft er ohne Filtrierhilfsmittel die Poren der Fritte und lässt sich so nicht entfernen. Im Filtrat lag neben dem Produkt noch eine geringe Menge Edukt vor. Obwohl davon auszugehen ist, dass der Alkohol im nächsten Schritt nicht reagiert, wurde das Produkt säulenchromatographisch an Normalphasen-Kieselgel gereinigt. Das Produkt lässt sich sehr einfach durch den Vergleich des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums mit dem des Edukts charakterisieren. Das Signal der CH<sub>2</sub>OH-Gruppe ( $\delta = 4,37\text{-}4,45$ ) des Edukts verschwindet und ein neues Singulett-Signal bei  $\delta = 9,61$  für das Proton des Aldehyds wurde detektiert.

#### **Darstellung von 1-(4-Cyclopentylamino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl)-ethanol (14)**

Die Synthese von **14** erfolgt in einer Grignard-Reaktion unter Umsetzung mit Methylmagnesiumbromid (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Darstellung von 14**

Die Synthese läuft unter den in der Literatur [13] beschriebenen Bedingungen nach dem in Abbildung 31 beschriebenen Mechanismus quantitativ ab. Das Produkt kann mittels Massenspektrometrie charakterisiert werden. Die Signale stimmen mit den in

der Literatur [13] angegebenen überein. Mittels DC konnten nach Extraktion mit Ethylacetat keine Nebenprodukte detektiert werden. Es wurde nach der Synthese auf eine aufwendige Reinigung des Produktes verzichtet, da die Reinheit für den Erfolg des nächsten Syntheseschritts unerheblich ist.

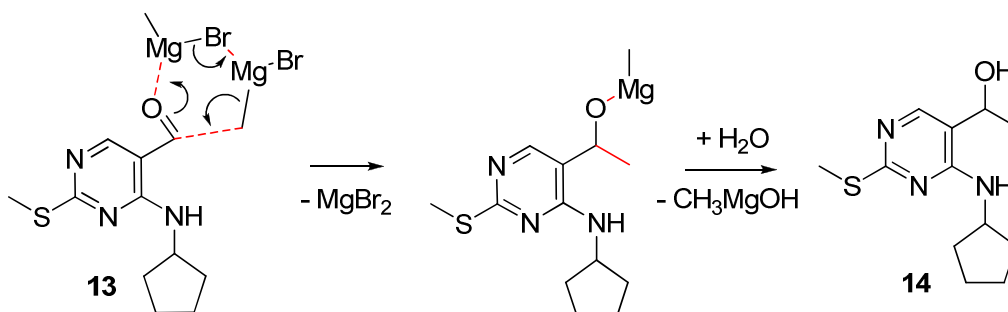


Abbildung 31: Mechanismus der Grignardreaktion zur Umsetzung von 13 zu 14

#### Darstellung von 1-(4-Cyclopentylamino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl)-ethanon (15)

Durch Umsetzung von 14 mit aktiviertem Braunstein kann 15 erhalten werden (Abbildung 32). Um bei dieser Umsetzung die maximale Ausbeute erzielen zu können, musste ein höherer Überschuss an  $\text{MnO}_2$  eingesetzt werden als für die Synthese von 13. In der Literaturvorschrift werden *N*-Methylmorpholinoxid (NMO) und katalytische Mengen Tetra-*N*-propylammonium-perruthenat verwendet [13]. Da die Oxidation unter Verwendung von  $\text{MnO}_2$  in ausreichenden Ausbeuten (82%) durchgeführt werden konnte, wurde auf die Anwendung des vorgeschlagenen Oxidationsmittels verzichtet.

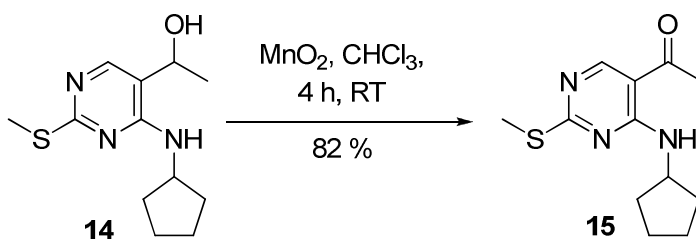


Abbildung 32: Darstellung von 15

#### Darstellung von 8-Cyclopentyl-5-methyl-2-methylsulfanyl-8*H*-pyrido[2,3-*d*]-pyrimidin-7-on (16)

Der Ringschluss zu 16 (Abbildung 33) wird durch die Horner-Wadsworth-Emmonsreaktion (HWE) erzielt.

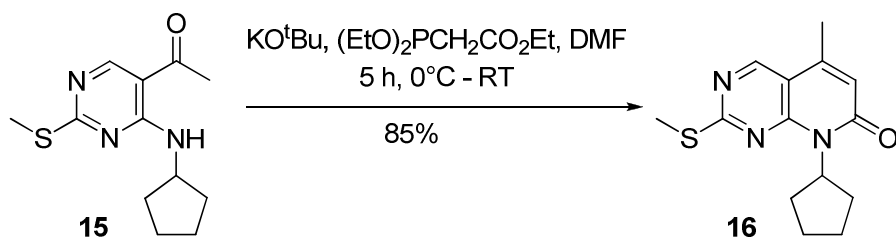


Abbildung 33: Darstellung von **16**

Die HWE-Reaktion stellt die Darstellung von Olefinen aus Aldehyden und Ketonen unter Verwendung von Alkanphosphonsäurediethylestern dar, wobei es im vorliegenden Fall zur Übertragung des Ethylacetylrests auf das Edukt kommt (Abbildung 34) [143-147]. Es entstehen  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketone und ein Phosphorsäurediethylester-Anion, das aufgrund seiner Wasserlöslichkeit einfach mit Wasser abgetrennt werden kann. Die HWE ist eine in der herkömmlichen organischen Synthese oft angewandte Alternative [144] zur Wittig-Olefinierung [148-150].

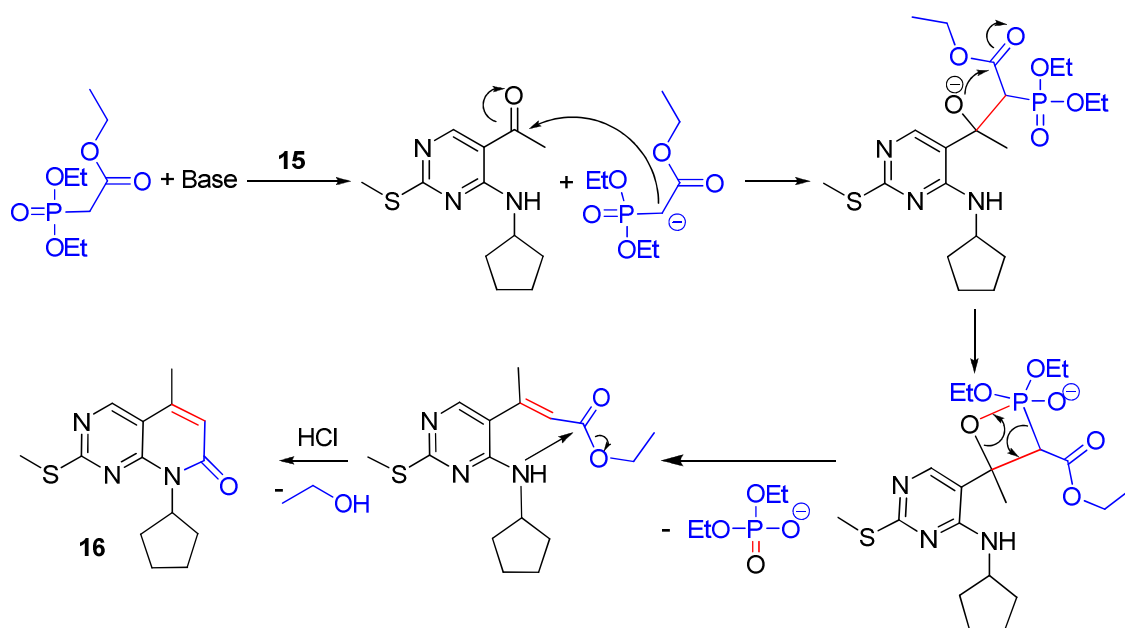


Abbildung 34: Bildung von **16** nach der Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion  
blau: Atome und Bindungen des Phosphons, rot: neu entstehende Bindungen

Durch den Einsatz von Phosphonsäureestern anstelle von Phosphoniumsalzen erzeugt man im Deprotonierungsschritt der Reaktion sehr stabile Ylid-Analoga und nimmt so Einfluss auf die Konfiguration der Produkte, die dabei fast ausschließlich als (*E*)-Isomere gebildet werden. Im Fall der vorliegenden Umsetzung von **15** zu **16** ist die Bildung von (*E*)-Isomeren im Anschluss an die Reaktion nicht mittels NMR nachweisbar, da es aufgrund der Aufarbeitung mit HCl zum intramolekularen Ringschluss durch Aminolyse kommt, wobei sich ein Lactam bildet. Eine Isolierung des



intermediär entstehenden Esters war nicht vorgesehen, die Bildung konnte allerdings per Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Im Massenspektrum des Reaktionsgemischs fand sich ein Signal entsprechend der Verbindung plus einem Natriumkation bei  $m/z = 344,21$   $[M+Na^+]$ .

Die Darstellung von **16** erfolgte zunächst nach Literaturangaben [13], in der von der Verwendung von frischem NaH (60% in Mineralöl) als Base ausgegangen wird. Das NaH und der Ethanphosphonsäurediethylester wurden in THF unter Schutzgasatmosphäre aufgeschlämmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von **15** als Feststoff und das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss erhitzt. Kurze Zeit nach dem Erhitzen verfärbte sich das Reaktionsgemisch von hellgelb über orange-rot nach dunkelbraun. Entgegen der Literaturvorschrift, in der eine Ausbeute von 66% angegeben ist, konnte kein Produkt isoliert werden. Dünnschichtchromatographische Analyse ergab die Bildung sehr vieler Nebenprodukte unter vollständigem Verbrauch des Ketons **15**. Eine MS-Analyse des Reaktionsgemischs konnte die Anwesenheit von **16** bestätigen, allerdings ließ sich das Produkt aufgrund der vielen Nebenprodukte, die ähnliche  $R_f$ -Werte in DC-Analysen mit unterschiedlichsten Laufmittelgemischen gaben, nicht isolieren. Es lag die Vermutung nahe, dass die Basenstärke von NaH zu hoch ist und es zur Zersetzung des Edukts kommt. Andererseits war es möglich, dass die hohe Reaktionstemperatur (120 °C) zur Zersetzung des Edukts bzw. Produkts führt.

Um die Reaktionsausbeute zu steigern und die Bildung von Nebenprodukten zu verhindern, wurden die optimalen Bedingungen einer Umsetzung von Alkylphosphonsäurediethylestern mit Fluorbenzaldehyd [128] auf diese Reaktion übertragen. Die Umsetzung erfolgt mit Kalium-*tert*-butylat unter Schutzgasatmosphäre in DMF. Das *tert*-Butylat-Ion weist eine geringere Basenstärke als das Hydridion auf. Sollte also die mögliche Zersetzung des Edukts auf die hohe Basenstärke des Hydridions zurückzuführen sein, wird das durch die Verwendung von Kalium-*tert*-butylat verhindert. Die Basenstärke des *tert*-Butylat-Ions ist für die Deprotonierung des Phosphonsäureesters ausreichend hoch.

Die Verwendung von DMF resultiert aus der besseren Löslichkeit des Ketons **15** in diesem Lösungsmittel. Das Kalium-*tert*-butylat wurde in DMF suspendiert und mittels Eisbad gekühlt. Das Keton **15** und Triethylphosphonacetat wurden ebenfalls in DMF gelöst und langsam zugegeben. Die Kühlung erfolgte mittels Eisbad, um die Wärmeentwicklung durch die stark exotherme Deprotonierung des Phosphonsäureesters abzufangen. Nach der Zugabe wurde das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch erwärmte sich langsam auf Raumtemperatur. Dabei verfärbte sich das Reaktionsgemisch langsam von hellgelb auf orange. Nach 5 h wurde im Reaktionsgemisch mittels DC kein Keton **15** mehr nachgewiesen. Eine Erhöhung der

Temperatur war also nicht nötig. In der DC-Analyse konnte nur eine geringe Bildung von Nebenprodukten festgestellt werden.

Um den Ringschluss zum Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin zu begünstigen, wurde das Reaktionsgemisch mit wenig konzentrierter Salzsäure neutralisiert. Der entstehende Phosphorsäurediethylester geht dabei in die wässrige Phase über und kann so abgetrennt werden. Nach der Extraktion wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt und mit einer Aubeute von 85% erhalten. Eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde nicht durchgeführt. Da die Reaktionsführung analog der Vorschrift von Gester *et al.* [128] höhere Ausbeuten in einer weniger aufwendigen Synthesedurchführung bringt, ist diese Darstellung zu bevorzugen.

Das Produkt ließ sich durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie charakterisieren. Die Bildung des Lactams **16** lässt sich anhand der Quintett-Aufspaltung des Cyclopentyl-CHs nachweisen (Abbildung 35). Die Verschiebung des Quintetts ändert sich im Vergleich zur Verschiebung des Multiplet-Signals des Cyclopentyl-CHs des Edukts **15** von 4,49 ppm auf 5,91 ppm. Das Proton der neu entstandenen Doppelbindung lässt sich als Singulett bei 6,44 ppm detektieren. Das Produkt konnte außerdem massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

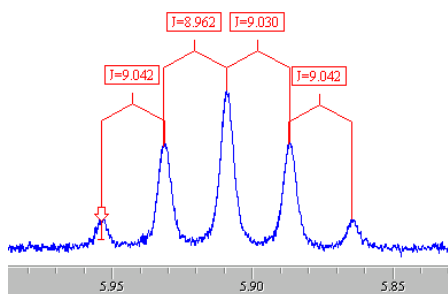


Abbildung 35: Ausschnitt des NMR-Spektrums der Verbindung **16**

### Darstellung von 8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-methylsulfanyl-8*H*-pyrido[2,3-*d*]-pyrimidin-7-on (**17**)

Auf den Ringschluss folgte die Synthese der an Position 6 iodierten Verbindung 8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-methylsulfanyl-8*H*-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-on (**17**) mit elementarem Iod (Abbildung 36).

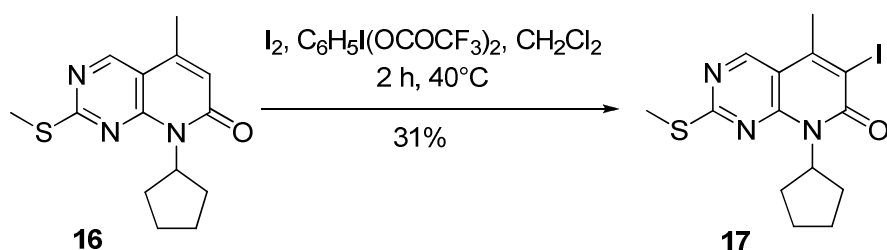


Abbildung 36: Darstellung von 17

Die Einführung des Iods erfolgt in einer elektrophilen aromatischen Substitution. Dazu muss das Iod mittels Oxidationsmittel in die elektrophile Form  $\text{I}^+$  überführt werden.

In diesem Fall erfolgte die Aktivierung mittels Bis(trifluoracetoxy)iodbenzol [151-153], da es eine milde Variante der Iodierung darstellt, unter Bildung weniger bis gar keiner Nebenprodukte. Die Reaktion verläuft nach dem in Abbildung 37 gegebenen Mechanismus. Die aktivierte Iodspezies, das Trifluoracetylhypoiodit, ist in der Lage, das Wasserstoffatom des Aromaten durch ein Iod zu ersetzen.

Die Darstellung erfolgte zunächst analog der Literaturvorschrift [13], nach der Iod und **16** in Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur gerührt werden. Nach einer halben Stunde erfolgt dann die Zugabe von Bis(trifluoracetoxy)iodbenzol. In der Literaturvorschrift wird eine Ausbeute von 66% angegeben, die nicht realisiert werden konnte. Nach dieser Anweisung wurden maximal 20% Produkt erhalten.

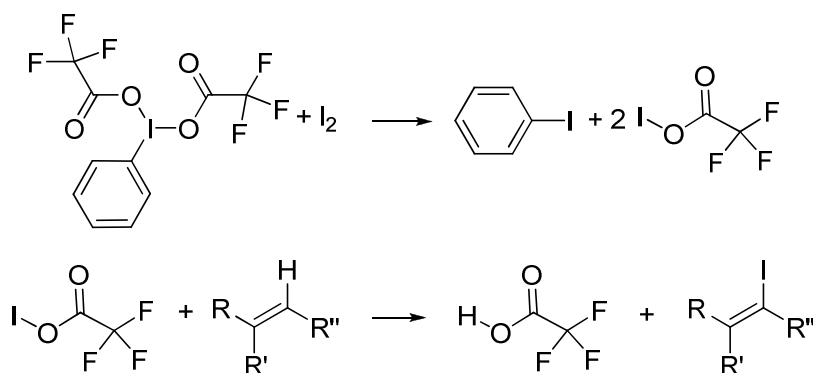


Abbildung 37: Mechanismus der Iodierung mit Bis(trifluoracetoxy)iodbenzol

Auch eine veränderte Durchführung, in der zuerst Bis(trifluoracetoxy)iodbenzol und Iod miteinander zur Reaktion gebracht wurden, gefolgt von der Zugabe der Verbindung **16** und anschließendem Erhitzen des Reaktionsgemischs unter Rückfluss brachte keine wesentliche Steigerung der Ausbeute. Es wurden maximal 31% Produkt erhalten. Wahrscheinlich ist die Verwendung eines anderen Oxidationsmittels für die elektrophile Substitution zu empfehlen. Dafür kämen Periodsäure oder Iodsäure ( $\text{HIO}_3$ ) infrage. Auf eine Optimierung der Reaktion unter Betrachtung des Oxidationsmittels wurde allerdings verzichtet. Die Identifikation des Produkts erfolgte mittels MS und  $^1\text{H}$ -NMR.

Das Proton der Doppelbindung in Position 6 des Edukts **16** lässt sich nach der Substitution erwartungsgemäß nicht mehr detektieren.

### Darstellung von 6-Acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-methylsulfanyl-8H-pyrido[2,3-d]-pyrimidin-7-on (**18**)

Die Darstellung von **18** erfolgte ausgehend von **17** in einer Stille-Kupplung (Abbildung 38).

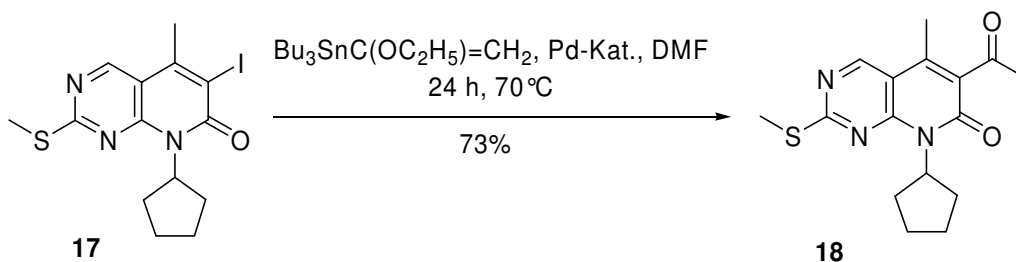


Abbildung 38: Darstellung von **18**

Die Stille-Kupplung ermöglicht die C-C Bindungsknüpfung zwischen Stannanen und Halogeniden [154]. Der Mechanismus der Stille-Kupplung verläuft über mehrere Teilschritte (Abbildung 39) und wird durch Palladium(0)-Komplexe katalysiert. Pd(II)-Salze finden ebenfalls Einsatz, da sie *in situ* reduziert werden können [155].

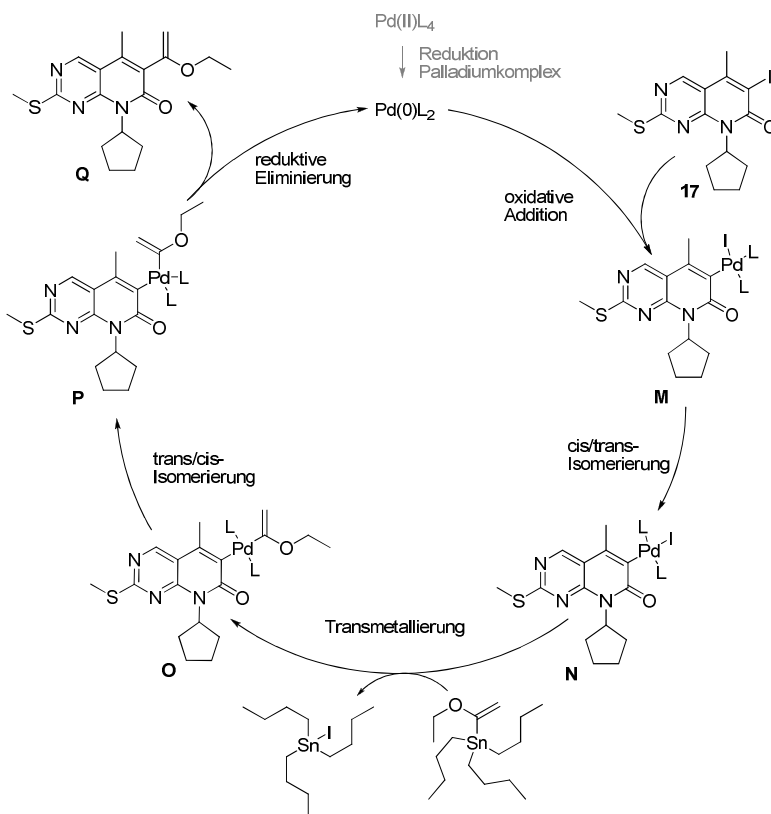
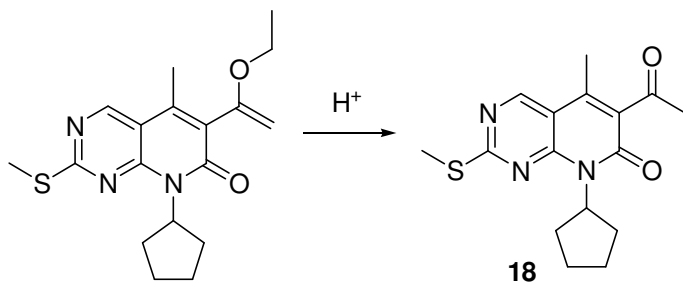


Abbildung 39: Bildung von **18** in einer Stille Kupplung

Das Methylketon bildet sich dann durch Verseifung des säurelabilen Enolethers **Q** und anschließender Keto-Enol-Tautomerisierung (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Umlagerung des Ethoxyvinylethers zur Verbindung 18**

Zunächst erfolgte die Synthese ähnlich einer in der Literatur [13] vorgeschlagenen Darstellungsrouten. In dieser Vorschrift wird die Darstellung eines Methylketons aus einer komplexeren Vorstufe besprochen. Das in der Literatur verwendete Edukt trägt im Gegensatz zur Verbindung **17** ein Bromatom an Position 6. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 8, Zeile 1 dargestellt und wurden auf die Umsetzung der iodierten Vorstufe **17** übertragen. Zu Beginn wurden **17** und der Katalysator Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium(0) in Toluol vermischt und auf 110 °C erhitzt. Nach Erreichen der Temperatur wurde das Ethoxyvinyltributylstannan in kleinen Portionen innerhalb von 5 h zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt und ein Aliquot mit verdünnter Salzsäure versetzt und daraufhin massenspektrometrisch untersucht. Es konnte weder das Methylketon noch das Ethoxyvinylderivat detektiert werden. Daher wurden die Bedingungen ähnlicher Reaktionen aus der Literatur [156-158] übernommen und auf ihre Eignung bezüglich der Darstellung des gewünschten Methylketons untersucht (Tabelle 8, Zeile 2-4).

**Tabelle 8: Optimierung der Stillekupplung**

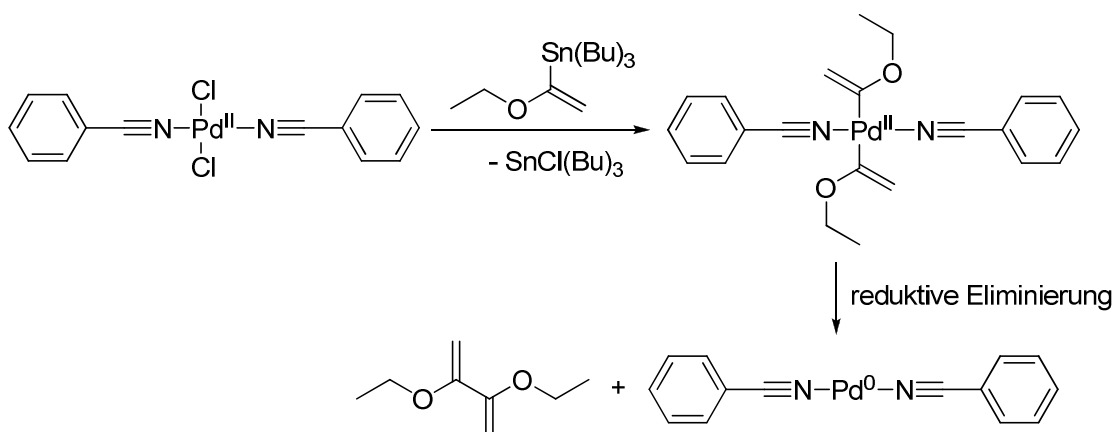
Es wurden jeweils 0,25 mmol **17** (1 äq.) eingesetzt

Lit.	LM	Stannan [mmol]	Katalysator [mmol]	Temp. [°C]	Dauer [h]	Ausbeute [%]
[13]	Toluol	1,38 (5,5 äq.)	(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Pd(0): 0,055 (0,01 äq.)	110	5	0
[156]	DMF	0,38 (1,5 äq.)	(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> PdCl <sub>2</sub> : 0,002 (0,01 äq.)	75	48	30
[157]	NMP	1,25 (5,0 äq.)	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub> : 0,085 (0,34 äq.) Ph <sub>3</sub> As: 0,01 (0,04 äq.)	70	15	70
[158]	DMSO*	0,3 (1,2 äq.)	(PhCN) <sub>2</sub> PdCl <sub>2</sub> : 0,013 (0,05 äq.)	60	24	73

\*statt Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT)

Diese Testsynthesen gingen von jeweils 0,25 mmol **17** aus und ergaben bei der Darstellung in DMSO mit Bis-benzonitrilpalladium(II)dichlorid die höchsten Ausbeuten bei Einsatz eines minimalen Überschusses an Ethoxyvinyltributylstannan. Die Ausbeute von 73% zeigt, dass der Austausch des Lösungsmittels (DMSO statt HMPT) keinen großen Einfluss auf das Syntheseergebnis hat.

Der verwendete Bis-benzonitrilpalladium(II)dichlorid-Katalysator wird vermutlich nach dem in Abbildung 41 beschriebenen Mechanismus zur Pd(0)-Spezies reduziert. Dabei kommt es erst zur Transmetallierung mit zwei Molekülen des stannylierten Edukts unter Austausch der Chloridliganden gegen das Ethoxyvinylat. Unter Ausbildung einer Homokupplung zwischen den beiden Ethoxyvinylresten wird das Palladium anschließend reaktiv aus der Bindung eliminiert und liegt somit für den Kreislauf der Stillekupplung als Pd(0)-Komplex vor. Daher wurde für die Reaktion ein entsprechender Überschuss an Stannylderivat eingesetzt. Die Reaktion muss unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt werden, da der entstandene Palladium(0)-Komplex sonst durch Luftsauerstoff zurück zu Pd(II) oxidiert werden könnte.



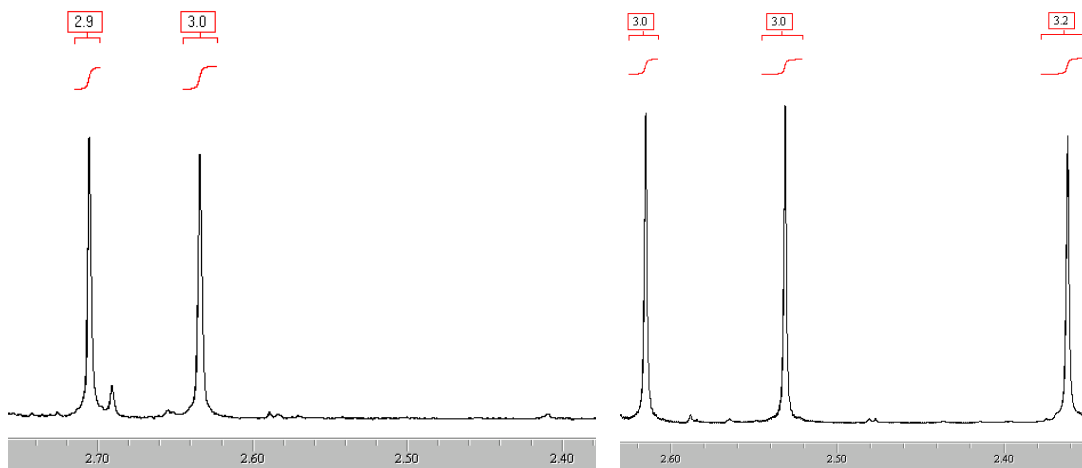
**Abbildung 41: *In situ*-Reduktion des Palladium(II)-Komplexes zu Pd(0)**

Erfolgt die Durchführung mit Trimethylzinnderivaten lässt sich das entstehende Trimethylstannylidiodid einfach durch Zugabe von Wasser entfernen, da es aufgrund seiner guten Löslichkeit in die wässrige Phase übergeht. Allerdings ist das Trimethylstannylidiodid wesentlich toxischer, als das bei der Verwendung von Tributylzinnderivaten entstehende Butylderivat. Aus diesem Grund wurde der Einsatz des Butylderivats bevorzugt. Dieses ist aber so lipophil, dass eine Extraktion mit Wasser nicht mehr in Frage kommt. Die Abtrennung mittels Destillation oder Säulenchromatographie ist sehr aufwendig und im Falle der Chromatographie wenig erfolgsversprechend. Die Produktfraktion lässt sich, unabhängig von der Wahl des Elutionsmittels, kaum vom entstandenen Tributylstannylidiodid abtrennen. Daher ist die

Herstellungsverfahren in DMSO zu bevorzugen. Durch den geringeren Einsatz an Ethoxyvinyltributylstannan ist die entstehende Menge an Tributylstannyljodid wesentlich geringer als bei der Darstellung in NMP mit der mehr als vierfachen Konzentration an Stannan.

Das überschüssige Tributylstannyljodid lässt sich durch Überführung in Fluoridderivate aus dem Reaktionsgemisch entfernen. Im Vergleich zu den Trialkylstannylbromiden, -chloriden und -iodiden sind die korrespondierenden Fluoridderivate nicht flüchtig, unlöslich in organischen Lösungsmitteln und weisen einen hohen Schmelzpunkt auf, da sie Polymere der Form  $[-(\text{CH}_3)_3\text{Sn-F}-(\text{CH}_3)_3\text{Sn-F}-(\text{CH}_3)_3\text{Sn-}]$  ausbilden [159]. Die Überführung in die entsprechenden Fluoride lässt sich durch Inkubation des Reaktionsgemischs in wässriger Kaliumfluoridlösung realisieren [160]. Der entstandene Tributylstannylfluoridniederschlag lässt sich abfiltrieren und es wird nach der Säulenchromatographie ein reines Produkt mit einer Ausbeute von 73% erhalten.

Das Produkt **18** kann durch  $^1\text{H-NMR}$  und MS charakterisiert werden. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind im Vergleich zu den zwei Singulettsignalen des Edukts ( $\text{CH}_3$ -Gruppe des Methylthioethers und Methylgruppe an Position 5) nun drei Singulettsignale, die jeweils drei Protonen entsprechen, zu sehen (Abbildung 42).

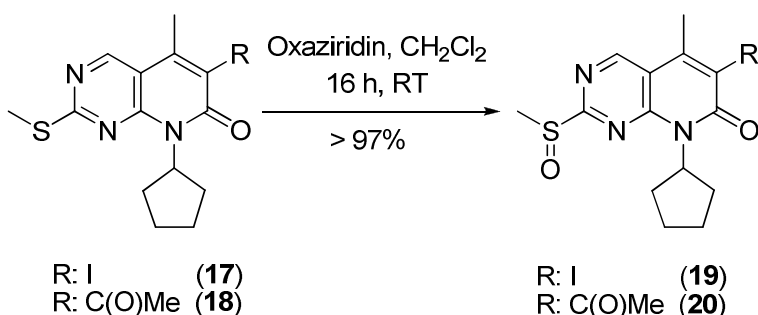


**Abbildung 42: Ausschnitt der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindungen **17** (links) und **18** (rechts)**

links: Signale der  $\text{CH}_3$ -Gruppe des Edukts **17** (Methylthioethers und Methylgruppe an Position 5) rechts: Signale der  $\text{CH}_3$ -Gruppen des Produkts **18** ( $\text{CH}_3$ -Gruppe des Methylthioethers und Methylgruppe an Position 5 und Methylgruppe des eingeführten Methylketons)

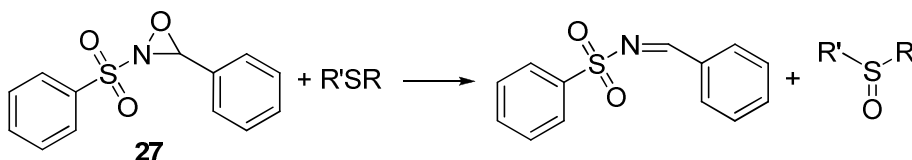
**Darstellung der Sulfoxide 8-Cyclopentyl-6-iod -5-methyl-2-methylsulfinyl -8H-pyrido[2,3-d]-pyrimidin-7-on (19) und 6-Acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-methylsulfinyl-8H-pyrido[2,3-d]-pyrimidin-7-on (20)**

Nach der Vorschrift von VanderWel *et al.* [13] können Alkylsulfoxide aus Thioethern durch Oxidation mit 2-Phenylsulfonyl-3-phenyl-oxaziridin (im folgenden als „Oxaziridin“ bezeichnet, **27**) hergestellt werden (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Darstellung von 19 und 20**

Die Oxidation erfolgt, um die Position 2 für den nukleophilen Angriff der Seitenkette zu aktivieren. Oxaziridine, heterocyclische Dreiringe aus je einem Sauerstoff-, Kohlenstoff und Stickstoffatom mit einer relativ schwachen N-O-Bindung, lassen sich durch Oxidation der korrespondierenden Sulfonylamine mit Peressigsäuren oder Oxon erzeugen [161]. Das für die Reaktion genutzte Oxaziridin **27** konnte nach einer Vorschrift von Davis *et al.* [162] hergestellt werden. Nach der vollständigen Trocknung im Vakuum und Lagerung bei 4 °C ist die Verbindung über mehrere Monate stabil. Die Ringöffnung ist die Triebkraft der Oxidation mit Oxaziridin, die die Darstellung von Sulfoxiden aus Thioethern unter milden Bedingungen ermöglicht. Die Weiteroxidation zum Sulfon verläuft auch bei einem Überschuss an Oxaziridin so langsam, dass sie fast gänzlich ausgeschlossen ist [161]. Die Oxidation erfolgt über einen S<sub>N</sub>2-Mechanismus, bei dem der Sauerstoff des Oxaziridins auf den Schwefel übertragen wird, der ein freies Elektronenpaar für die Bindung bereitstellt [161]. Dabei entsteht wieder das Sulfonylamin (Abbildung 44) und das gewünschte Sulfoxid **19** bzw. **20**.



**Abbildung 44: allgemeiner Mechanismus der Oxidation eines Thioethers mit dem Oxaziridin 27**



### 3.2.2 Synthese der Seitenketten

Die Darstellung der Anilinseitenketten **7** und **9** sowie der Pyridinseitenketten **8** und **10** aus 1-Nitro-4-fluorbenzen bzw. 5-Brom-2-nitropyridin erfolgt in einer zwei bzw. dreistufigen Synthese.

#### Darstellung von *N*-Boc-4-(4-nitrophenyl)piperazin (**1**)

Das Anilinderivat **1** lässt sich durch nukleophile Substitution des Fluoratoms durch das primäre Amin des 1-Boc-Piperazins darstellen (Abbildung 45). Die Umsetzung erfolgte analog der Literaturbedingungen [13] und das Produkt konnte mittels <sup>1</sup>H-NMR und MS charakterisiert werden. Der Einsatz des Boc-geschützten Piperazins vereint zwei Vorteile: Einerseits verhindert die Schutzgruppe das Auftreten doppelt substituierter Produkte aus zwei Molekülen des Anilins verbunden durch das Piperazin. Andererseits muss das sekundäre Amin des Piperazins im Verlauf der Reaktionsfolge Boc-geschützt werden, um es später an das Grundgerüst koppeln zu können. Die Reaktionsfolge kann also durch Verwendung von bereits geschütztem Piperazin um einen Reaktionsschritt verkürzt werden.

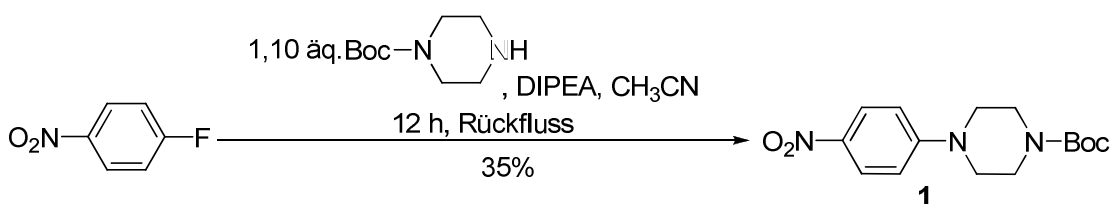


Abbildung 45: Darstellung von Verbindung **1**

#### Darstellung von *tert*-Butyl-4-(6-nitropyridin-3-yl)piperazin-1-carboxylat (**3**)

Die Darstellung von *tert*-Butyl-4-(6-nitropyridin-3-yl)piperazin-1-carboxylat (**3**) erfolgte zunächst nach den Literaturbedingungen [12] (Abbildung 46). Es war möglich, die Seitenkette **3** ausgehend vom 5-Brom-2-Nitropyridin in einer zweistufigen Syntheseroute über die Darstellung des ungeschützten Derivats 1-(6-Nitropyridin-3-yl)-piperazin (**2**) herzustellen. Dazu erfolgte zunächst die Kupplung des Pyridin-Derivats mit dem Piperazin. Dessen freies sekundäres Amin wurde im nachfolgenden Schritt über die Umsetzung mit Di-*tert*-butyldicarbonat geschützt. Die direkte Darstellung des Boc-geschützten Derivats **3** unter den gleichen Bedingungen wie zur Darstellung von **1** konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden.

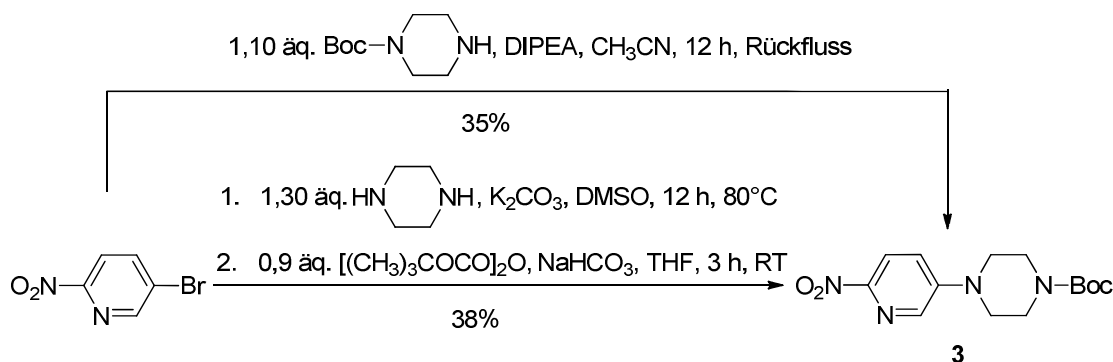


Abbildung 46: Darstellung der Verbindung 3

Die Ausbeuten sind ähnlich, die Umsetzung verläuft nahezu quantitativ, weshalb auf eine intensive Reinigung des Produktes verzichtet wurde. Um eine Zweifachsubstitution aus zwei Molekülen des Pyridins verbunden durch ein Piperazin zu vermeiden, wurde ein Überschuss an Piperazin (1,30 äq.) eingesetzt. Die Bildung zweifachsubstituierter Produkte wurde nicht beobachtet. Die darauffolgende Einführung der Schutzgruppe geschieht mit geringer Ausbeute (40%). Damit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 38% für beide Reaktionsschritte. Die direkte Umsetzung mit Boc-Piperazin ergibt ähnliche Ausbeuten von ca. 35%. Die Ausbeute der Zweischriffsynthese ist unwesentlich höher, der Syntheseweg aber um ein Vielfaches aufwendiger und zeitintensiver, daher ist die Strategie der direkten Umsetzung mit 1-Boc-Piperazin vorzuziehen. Die Reaktion findet in Acetonitril statt, das sich leicht entfernen lässt. Die Umsetzung in der zweistufigen Synthese erfolgt zum Teil in DMSO, das sich auch im Hochvakuum kaum entfernen lässt und eine Charakterisierung des Produkts mittels <sup>1</sup>H-NMR erschwert.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nach der Einschriffsynthese mit Boc-Piperazin zeigt sehr deutliche Aufspaltungen der Protonen des Pyridinrings. Eine Zuordnung der Signale kann über die Kopplungskonstanten erfolgen (Abbildung 47), die mit steigender Anzahl an Bindungen zwischen den koppelnden Protonen immer schwächer wird. So weist eine vicinale Kopplung (z.B. H-C-C-H, <sup>3</sup>J) Kopplungskonstanten von 0-20 Hz auf, während eine *long range* Kopplung über vier und mehr Bindungen (z.B. H-C-C-C-H, <sup>4</sup>J) maximale Werte von 0-3 Hz zeigt [163]. Da sowohl die Protonen vom Kohlenstoffatom-1, als auch die am Kohlenstoffatom-3 mit den Protonen des Kohlenstoffatoms-2 in Wechselwirkung treten, kommt es an dieser Stelle zur Aufspaltung in ein Duplett vom Duplett (Abbildung 47). Diese zeigt die gleichen Kopplungskonstanten wie die Signale für 1-H und 3-H. Damit lassen sich die Signale wie in Abbildung 47 dargestellt, zuordnen. Die Signale des Piperazinrings sind in Abbildung 48 dargestellt.

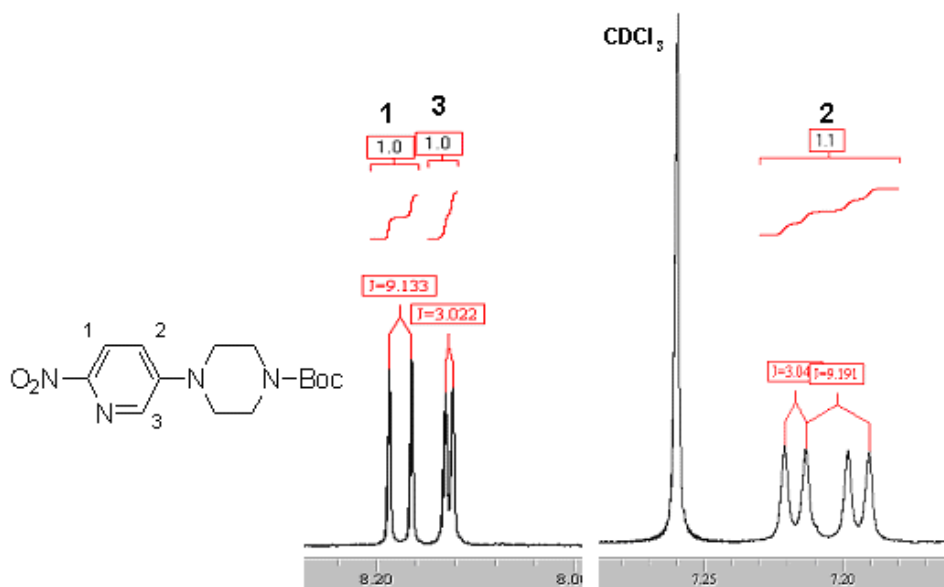


Abbildung 47: Ausschnitt des <sup>1</sup>H-NMR Spektrums der Verbindung 3 (Pyridinringssignale)

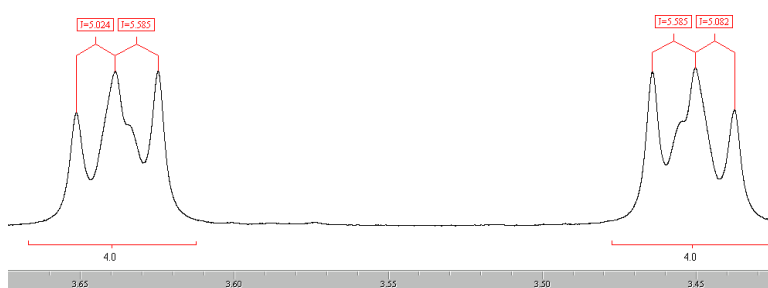


Abbildung 48: Ausschnitt des <sup>1</sup>H-NMR Spektrums der Verbindung 3 (Piperazinringssignale)

Sowohl für die Darstellung der Anilinseitenkette **1** als auch der Pyridinseitenkette **3** wurde neben dem Piperazinderivat eine Base verwendet, um entstehenden Brom- bzw. Fluorwasserstoff abzufangen. Das als Base verwendete DIPEA bildet mit dem Bromwasserstoff ein Ammoniumsalz, das als Niederschlag ausfällt. Das (Boc-geschützte) Piperazin wurde jeweils im leichten Überschuss zugegeben, da es ebenfalls als Base fungieren und somit als Ammoniumderivat ausfallen könnte. Die geringen Ausbeuten der Reaktion können eventuell darin begründet sein, dass ein Teil des Piperazins mit dem Halogenwasserstoff als Salz ausgefallen ist und so der Reaktion entzogen wurde. Es wurden allerdings keine Versuche unter Verwendung eines größeren Überschusses an (Boc-geschützten) Piperazin durchgeführt.

### Fluorethylierung der Seitenketten

Für die Darstellung der fluorierten Referenzsubstanzen (Abbildung 49) bot es sich an, direkt die Seitenkette zu fluorethylieren. Dazu darf die Seitenkette am Piperazin nicht Boc-geschützt vorliegen. Es bestand die Möglichkeit, die Verbindungen **1** und **3** zu entschützen, um das sekundäre Amin für die Umsetzung zu erschließen. Die direkte Einführung von ungeschütztem Piperazin in das Molekül und anschließender Fluorethylierung mit kommerziell erhältlichem 1-Brom-2-Fluorethan (BFE) [164] stellt allerdings die ökonomisch sinnvollere Variante dar, da kommerziell erhältliches 1-Boc-Piperazin wesentlich teurer ist als ungeschütztes Piperazin. Demzufolge wurden beiden Edukte mit ungeschütztem Piperazin dargestellt. Die Darstellung von 1-(4-Nitrophenyl)piperazin (**4**) orientierte sich an der Darstellung von **1**, unter Verwendung eines sehr großen Überschusses an ungeschütztem Piperazin von 2,30 äq. in Bezug auf das 1-Nitro-4-fluorbenzen. Das reine Produkt **4** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 79% isoliert werden. Die Bedingungen der Fluorethylierung ähneln der Darstellung eines NMDA-Rezeptorliganden von Piel *et al.* [164].

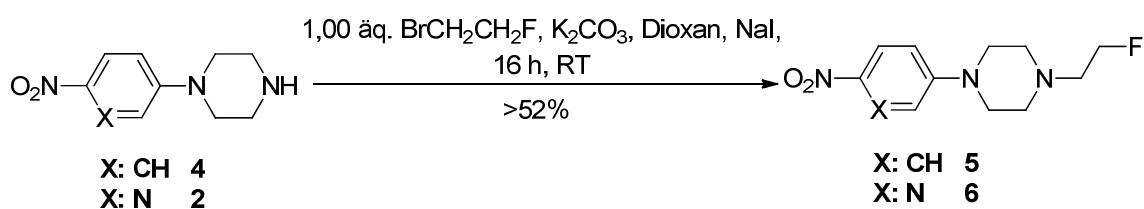
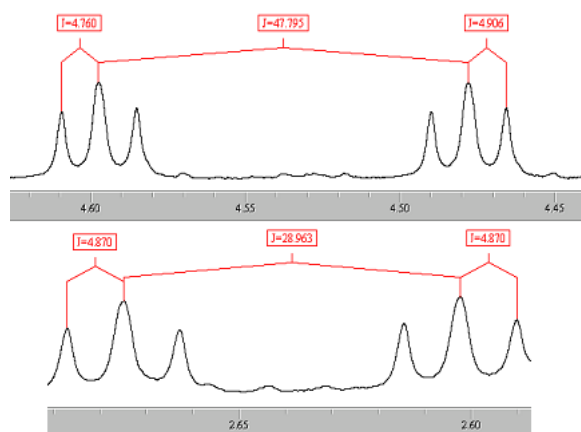


Abbildung 49: Darstellung von **5** und **6**

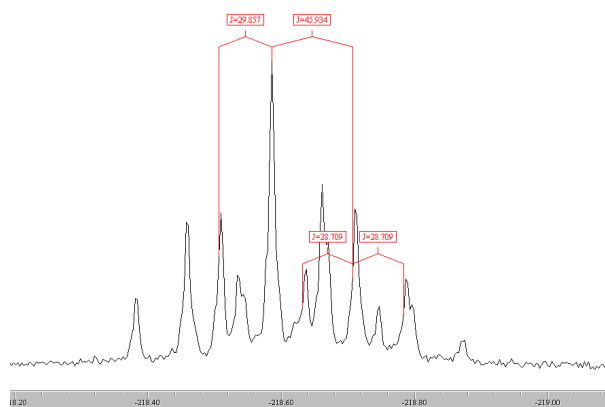
Dazu werden Kaliumcarbonat, **2** bzw. **4** und 1-Brom-2-fluorethan in Dioxan gelöst. Durch die Zugabe von NaI kann die Reaktionsausbeute verbessert werden, es kommt zu einer Finkelstein-ähnlichen Aktivierung des 1-Brom-2-Fluorethans. Das Bromatom wird *in situ* durch ein Iodatomb austauscht. Da Iod eine bessere Abgangsgruppe als Brom darstellt, verläuft die Anbindung an das Piperazin in kürzerer Zeit mit besseren Ausbeuten. Die Verbindung **5** konnte in einer Ausbeute von 54% nach der säulenchromatographischen Reinigung erhalten werden, Verbindung **6** mit einer Ausbeute von 52%.

Exemplarisch sind in Abbildung 50 die Signale der Fluorethylkette der Verbindung **6** im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum gezeigt. Das Fluoratom führt zu einer starken Aufspaltung der Signale der Protonen beider CH<sub>2</sub>-Gruppen. Die geminale H-C-F-Bindung zeigt laut Literatur [163] eine Kopplungskonstante von 47 Hz, die vicinale H-C-C-F-Bindung

immerhin einen Wert von 25 Hz. Bei Auswertung der NMR-Spektren konnte für die geminale Bindung eine Kopplungskonstante von 48 Hz und 29 Hz für die Vicinale gefunden werden (Abbildung 50). Diese Kopplungskonstanten finden sich im  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum wieder (Abbildung 51).



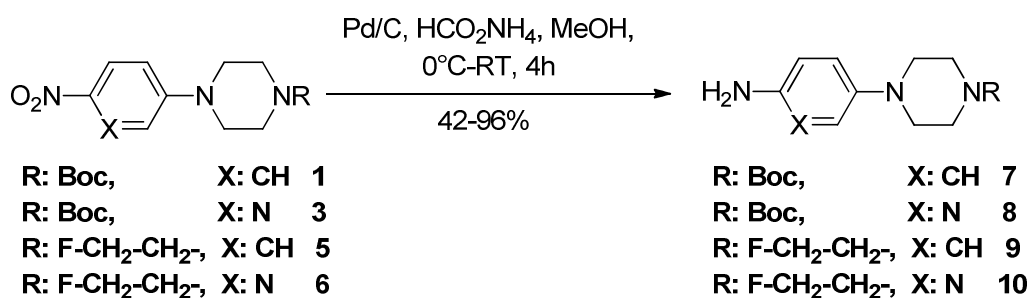
**Abbildung 50: Ausschnitte des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von 6 (Fluorethylgruppe)**  
oben: Aufspaltung der  $\text{F}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -Gruppe, unten: Aufspaltung der  $\text{F}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -Gruppe



**Abbildung 51:  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum der Verbindung 6**

### Reduktion der Seitenketten

Die Nitrofunktion musste, um über ein gutes Nucleophil zu verfügen, zum primären Amin reduziert werden (Abbildung 52). Die Literaturvorschrift geht von einer Reduktion mit Raney-Nickel in THF innerhalb von 5 h bei einem Wasserstoffdruck von 3,5 bar aus [108]. Da die technischen Möglichkeiten vor Ort begrenzt waren, konnte dieser Weg nicht verfolgt werden.



**Abbildung 52: Reduktion der Nitrogruppe zum primären Amin**

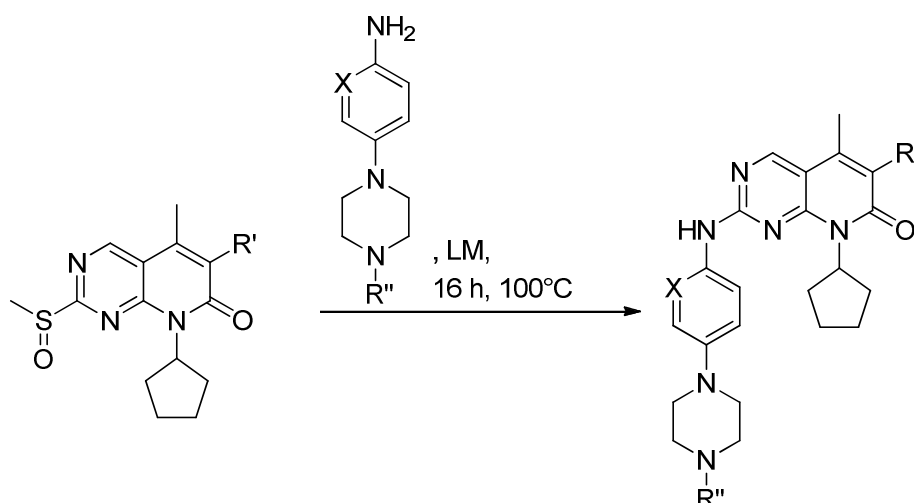
Eine sehr selektive Methode zur Reduktion von Nitrogruppen stellt die Umsetzung mit Zinn(II)chlorid in konzentrierter Salzsäure und Methanol dar. Mit dieser Variante lässt sich die Nitroverbindung **1** zum Amin **7** reduzieren. Allerdings entsteht bei der Umsetzung Zinn(IV)hydroxid als sehr feinpulvriger Niederschlag im Reaktionsgemisch, welcher sich sehr schlecht abfiltrieren lässt. Um den Niederschlag vollständig zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch zentrifugiert und anschließend der Überstand, der das Produkt enthält, abgenommen. Das Pellet wurde in Methanol aufgeschlemmt und erneut zentrifugiert. Dieser Prozess wurde dreimal wiederholt, um die größtmögliche Ausbeute zu erhalten. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend im Vakuum eingeeengt und säulenchromatographisch gereinigt. Die Ausbeute liegt bei 30%. Allerdings ist die Aufarbeitung sehr aufwendig und daher für weitere Experimente nicht zu empfehlen und wurde für die Reduktion der anderen drei Nitroverbindungen nicht angewendet.

Einen sprunghaften Anstieg in der Ausbeute brachte die katalytische Hydrierung unter Verwendung eines Palladium/Aktivkohle-Katalysator. Die katalytische Transfer-Hydrierung stellt dabei eine effiziente, schnelle und vor allem einfach zu handhabende Möglichkeit zur Reduktion von Nitroverbindungen dar. Auf gasförmigen Wasserstoff wurde zugunsten der leicht dehydrierbaren/oxidierbaren Verbindung Ammoniumformiat als Wasserstoffquelle verzichtet [165]. Es konnten im Durchschnitt 85% Produkt erzielt werden, nur die Umsetzung von **6** zu **10** lieferte mit 42% wesentlich geringere Ausbeuten. Diese Umsetzung erfolgte allerdings nur einmal, eine Verlängerung der Reaktionszeit könnte zu höheren Ausbeuten führen.

### 3.2.3 Anbindung der Seitenketten an die Grundgerüste

Die Einführung der Seitenkette in Position 2 des Grundgerüsts unter Abspaltung der Methylsulfoxidgruppe erfolgte ebenfalls nach Literaturvorschrift [12, 13] (Abbildung 53).

Eine ausreichende Optimierung der Reaktionen in Bezug auf Temperatur, Zeit und Lösungsmittel war aufgrund der geringen Substanzmengen und des hohen Syntheseaufwands des Grundgerüsts nicht möglich. VanderWel *et al.* schlagen die Darstellung in DMSO, Toogood *et al.* in Toluol vor [12, 13]. Die Anbindung der Seitenketten **7** bzw. **9** an **19** bzw. **20** erfolgte zuerst analog der Literaturvorschrift [13] in DMSO bei 130 °C. Es wurde ein geringer Überschuss der Seitenkette eingesetzt. Bei der Darstellung von **21** konnten 75% Ausbeute erhalten werden, die Synthese von **23** gelang immerhin mit 61% Ausbeute. Im Reaktionsgemisch konnte bei massenspektrometrischer Untersuchung zur Verfolgung des Reaktionsverlaufs nach ca. 16 h kein Signal für das Grundgerüst mehr gefunden werden. Das lässt darauf schließen, dass es während der Synthese vollständig aufgebraucht wurde. Das Signal der Seitenkette konnte detektiert werden, da diese Verbindung im Überschuss zugesetzt wurde.



**Abbildung 53: Kupplung der Seitenketten an die Grundgerüste**  
X, R' bzw R'' siehe Tab. 9

**Tabelle 9: Bezeichnung der einzelnen Verbindungen**

Bezeichnung	X	R'	R''	LM	Ausbeute
<b>21</b>	CH	-I	Boc-	DMSO	75%
<b>22</b>	N	-I	Boc-	Toluol	38%
<b>CKIC</b>	CH	-I	Fluorethyl-	DMSO/Toluol	-
<b>CKID</b>	N	-I	Fluorethyl-	DMSO/Toluol	-
<b>23</b>	CH	-COMe	Boc-	DMSO	61%

Die Anbindung der fluorethylierten Seitenkette **9** zur Darstellung von **CKIC** und **CKIE** schlug fehl. Die DC-Auswertung des Reaktionsgemischs ergab die Bildung sehr vieler Nebenprodukte. In der massenspektrometrischen Analyse des Reaktionsgemischs

konnte das gewünschte Signal des Produkts nicht gefunden werden. Ebenso war es nicht möglich, das Signal der Seitenkette zu detektieren. Wahrscheinlich kommt es bei diesen Reaktionsbedingungen zur Zersetzung der fluorierten Seitenkette. Da das Signal des Grundgerüsts noch detektierbar war, ist anzunehmen, dass es gar nicht erst zur Umsetzung des Grundgerüsts mit der Seitenkette kommt. Auch eine Änderung des Lösungsmittels zu Toluol brachte keinen Erfolg.

Die Anbindung der Pyridinseitenketten **8** und **10** konnte in DMSO ebenfalls nicht realisiert werden. Eine DC-Untersuchung nach einer Stunde zeigte die Abwesenheit der Seitenkette ohne die Bildung der gewünschten Edukte.

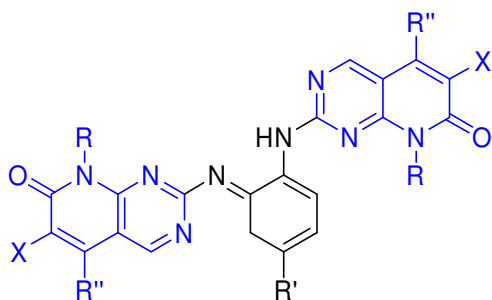
Die Verbindung **22** konnte allerdings in Toluol bei reduzierter Temperatur (100°C) erfolgreich dargestellt werden (38% Ausbeute). Als zusätzlich vorteilhaft erwies sich die Tatsache, dass **22** in Toluol unlöslich ist, somit konnte das Produkt nach der Synthese einfach abfiltriert werden. Diese Reaktionsbedingungen ließen sich jedoch nicht auf die Kupplung der Seitenketten **7** und **9** an das Grundgerüst anwenden. Deren Umsetzung in Toluol gelang nicht, daher mussten die Produkte **21** und **23** nach der Umsetzung in DMSO und Verdünnen des Reaktionsgemischs mit Wasser mittels Ethylacetat extrahiert werden.

Der Versuch, die Pyridinseitenkette **8** an das Methylketon **20** zu binden, blieb jedoch auch in Toluol erfolglos. Eine Erklärung für die vergleichsweise geringen Ausbeuten der Anbindung der Pyridinseitenkette könnte in der veränderten Nukleophilie der Seitenkette liegen. Der Stickstoff im aromatischen Ring setzt anscheinend die Nukleophilie der Seitenkette im Vergleich zum Anilinderivat herab. Dadurch erfolgt ein schwächerer Angriff auf das Sulfoxid und die Ausbeute ist geringer. Die Nukleophilie einer Verbindung hängt auch vom verwendeten Lösungsmittel ab, weswegen möglicherweise die Reaktion in Toluol im Vergleich zu DMSO überhaupt erst stattfindet.

Bei sämtlichen Synthesen wurde die Bildung mehrerer Nebenprodukte verbunden mit einer moderaten bis geringen Ausbeute an Produkt beobachtet. Toogood *et al.* konnten ebenfalls feststellen, dass die Reaktion zur Bildung mehrerer Nebenprodukte führt. Ihre Untersuchungen ergaben, dass das Methylsulfoxid zu einem gewissen Teil zum korrespondierenden Alkohol (2-Hydroxypyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-on-Derivate) umgewandelt wird, welches auch beim Arbeiten in wasserfreien Medien entstand. Sie gehen davon aus, dass der Alkohol durch Umlagerung des Sulfoxides entsteht. Zusätzlich stellten sie fest, dass auch 2:1-Addukte, analog Abbildung 54, gebildet werden, deren Anteil im Reaktionsgemisch durch Verringerung des



Seitenketten/Grundgerüst-Verhältnisses minimiert, aber nicht ausgeschlossen werden kann [12].

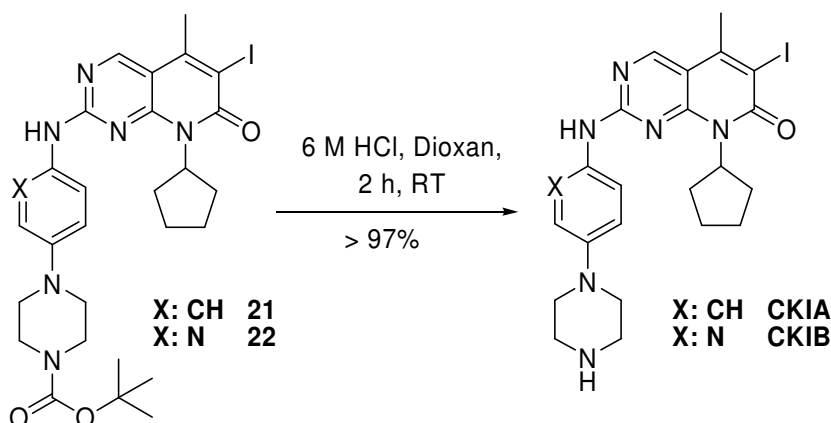


**Abbildung 54: Schema der 2:1-Addukte nach Toogood *et al.* [12]**  
 blau: Grundgerüst, schwarz: Seitenkette

### 3.2.4 Synthese der Referenzsubstanzen CKIA und CKIB und deren Markierungsvorstufen

#### Darstellung der Referenzsubstanzen CKIA und CKIB

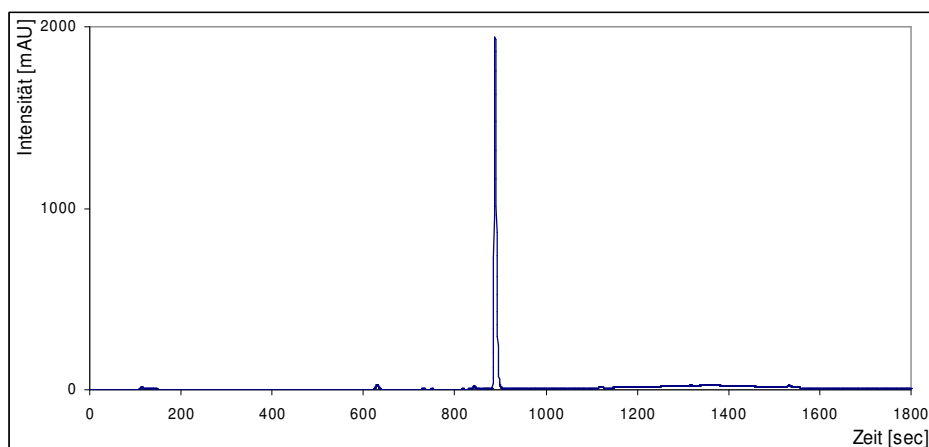
Die Referenzsubstanzen der iodmarkierten Verbindungen **CKIA** und **CKIB** lassen sich durch Entschützung der Verbindungen **21** und **22** darstellen (Abbildung 55). Dazu wird das Edukt bei Raumtemperatur für 2 h in einem Gemisch aus 6 M Salzsäure und Dioxan gerührt. Die Entschützung verläuft quantitativ, das Produkt lässt sich aus einem Methanol/Petrolethergemisch ausfällen und wird säulenchromatographisch gereinigt. Die Referenzsubstanzen konnten mittels  $^1\text{H}$ -NMR und Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Für die Verbindung **CKIA** stimmen die gefundenen Werte mit denen der Literatur überein. Die Verbindung **CKIB** wurde noch nicht in der Literatur beschrieben.



**Abbildung 55: Darstellung der Referenzsubstanzen CKIA und CKIB**

Da bei Radiosynthesen das Produkt nur in nanomolaren Mengen hergestellt wird, ist es nicht möglich, die herkömmlichen Analysemethoden zur Produktcharakterisierung zu

nutzen. Die Charakterisierung erfolgt daher über den chromatographische Verfahren. Da die Retentionszeiten und  $R_f$ -Werte der radioaktiven Substanz mit denen der Referenzsubstanz übereinstimmen müssen, ist eine hohe Reinheit der Referenzsubstanz unabdingbar. Des Weiteren soll die Referenzsubstanz für die biologische Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Damit lässt sich die inhibitorische Wirkung der Verbindungen auf Zellen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus untersuchen, um herauszufinden, ob die Verbindungen ausreichend potent sind und sich für die radiopharmakologische Untersuchungen eignen. Abbildung 56 zeigt ein HPLC-Chromatogram der Verbindung **CKIA** aufgenommen mit einem UV-Detektor. Das Chromatogram bestätigt die hohe chemische Reinheit (>98%) der Verbindung. Für die Verbindung **CKIB** konnte eine chemische Reinheit >97% bestimmt werden.



**Abbildung 56: Analytisches HPLC-UV-Chromatogram der Verbindung CKIA**

### Darstellung der Markierungsvorstufen

Organostannylderivate sind als Markierungsvorstufen für die Radioiodierung sehr verbreitet, da sie eine regioselektive Markierung unter milden Bedingungen mit hohen Ausbeuten erlaubt.

Die Zinnmarkierungsvorstufen lassen sich mit guten Ausbeuten aus Iod- und Bromderivaten herstellen. Um die Reaktionsfolge zu vereinfachen, wurde die Markierungsvorstufe daher direkt aus den iodierten Verbindungen **21** und **22** hergestellt (Abbildung 57). Die Durchführung fand im Mikromaßstab statt, da einerseits die Darstellung der Vorstufen eine nur geringe Gesamtausbeute ergab und andererseits für die Radioiodierung nur eine geringe Menge an Markierungsvorstufe benötigt wird.

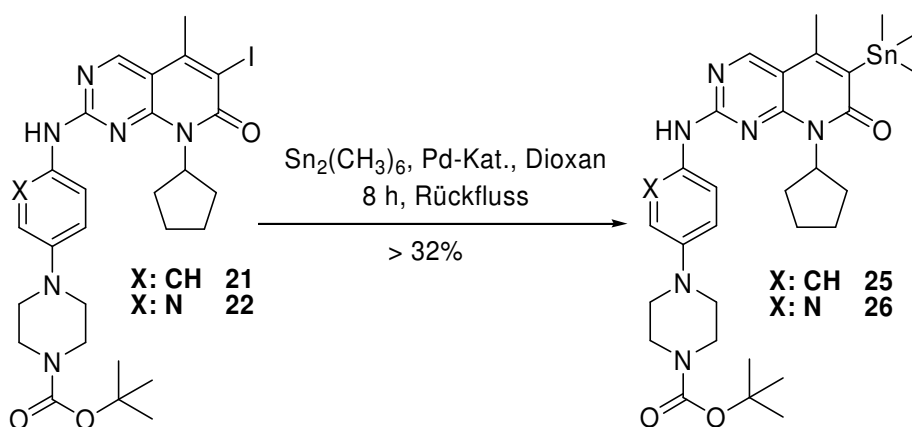


Abbildung 57: Darstellung der Markierungsvorstufen **25** und **26**

Die Markierungsvorstufen erhält man durch Umsetzung der Verbindungen **21** und **22** mit Hexamethyldistannan in Dioxan. Die Reaktion wird durch Tetrakis-triphenylphosphinpalladium(0) katalysiert. Nach einer Reaktionszeit von acht Stunden unter Rückfluss wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt und das Lösungsmittelvolumen im Vakuum auf ca. 1,5 ml reduziert. Der Rückstand wurde ohne vorherige Abtrennung des Palladiumkatalysators säulenchromatographisch gereinigt. Die Markierungsvorstufe wird für die Radiomarkierungen in geringsten Stoffmengen eingesetzt und muss somit eine hohe Reinheit aufweisen. Das überschüssige Hexamethyldistannan besitzt einem R<sub>f</sub>-Wert von 1,0 und wird somit mit dem Totvolumen von der Säule eluiert. Da das Produkt einen R<sub>f</sub>-Wert von 0,46 aufweist, kann eine vollständige Abtrennung erzielt werden.

Die vinyliche Iod-Kohlenstoff-Bindung der Vorstufe ist gegenüber den Reaktionsbedingungen so unempfindlich, so dass es höchstwahrscheinlich nicht zur Deiodierung ohne zeitgleicher Stannylierung kam. In der massenspektrometrischen Untersuchung des Reaktionsgemisches konnte kein Signal für die deiodierte Verbindung gefunden werden. Die stannylierten Markierungsvorstufen sollten möglichst lichtgeschützt bei geringen Temperaturen gelagert werden, um eine eventuelle Zersetzung zu vermeiden. Daher wurde die Markierungsvorstufe in Chloroform gelöst (5 mg/ml) und in Portionen von maximal 250 µg in verschließbare Glasvials (Volumen 1 ml) aliquotiert. Das Lösungsmittel wurde im Argonstrom entfernt und die Gläschen fest verschlossen (zusätzlich Parafilm). Die Lagerung erfolgte unter Argonschutzgas bei -70 °C. Unter diesen Bedingungen sind die Verbindungen mindestens zwölf Monate stabil.

Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren bestätigen die Darstellung der Markierungsvorstufen. Vor allem das sehr charakteristische Signal der Protonen der Trimethylstannylgruppe mit seinen

zwei Satelliten infolge der Kopplungen zu  $^{117}\text{Sn}$  (7,7% natürliche Häufigkeit) und  $^{119}\text{Sn}$  (8,6% natürliche Häufigkeit) kann detektiert werden. Die Kopplungskonstanten der Verbindung **CKIB** sind in Abbildung 58 exemplarisch dargestellt und betragen  $^3J = 29\text{ Hz}$  und  $^3J = 27\text{ Hz}$ . Bei der Verbindung **CKIA** kommt es ebenfalls zur Aufspaltung der Zinn-Satelliten. Die gemessenen Kopplungskonstanten entsprechen denen der Verbindung **CKIB**.

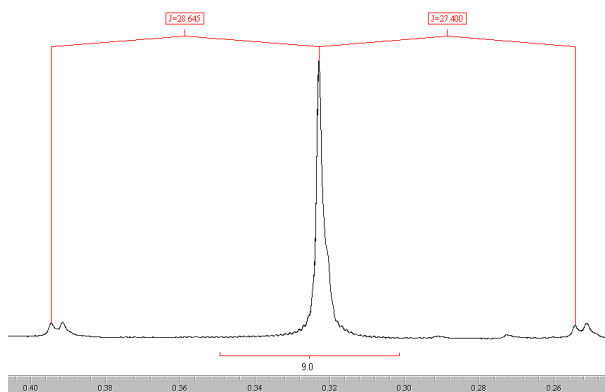


Abbildung 58:  $^1\text{H}$ -NMR-Signal der Trimethylstannylgruppe von **CKIB**

Die Aufspaltung der Signale des Pyridinrings der Verbindung **CKIB** konnte erneut festgestellt werden (vgl. 3.2.2). Es konnten die gleichen Kopplungskonstanten wie bei der entsprechenden Seitenkette gemessen werden (Abbildung 59).

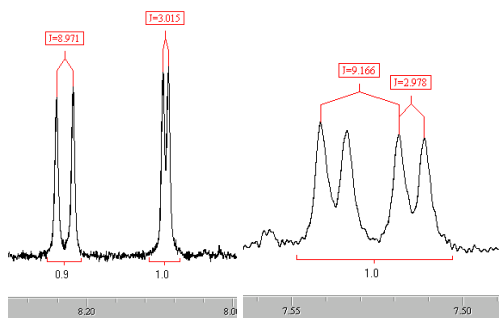


Abbildung 59:  $^1\text{H}$ -NMR-Signale des Pyridinrings der Verbindung **CKIB**

Das Massenspektrum der beiden Verbindungen zeigt ebenfalls die charakteristische Aufspaltung aufgrund der vielen Zinnisotope. So konnten neben dem Massensignal für die Verbindung **CKIB** ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) bei 692,23 (100%) noch weitere Signale bei 690,18 (ca. 78% des Massesignals) und 691,20 (ca. 56% des Massesignals) für die Zinnisotope  $^{120}\text{Zn}$  (32,6% relative Häufigkeit),  $^{118}\text{Zn}$  (24,2% relative Häufigkeit) und  $^{119}\text{Zn}$  (8,6% relative Häufigkeit) festgestellt werden.

### 3.2.5 Synthese der Referenzsubstanzen CKIC und CKID

Für die Markierung mit  $^{18}\text{F}$  wurde die Strategie der Fluorethylierung verfolgt. Dazu sollte eine Zweischnitt-Radiosynthese Anwendung finden, bei der zuerst ein  $^{18}\text{F}$ Fluorethylierungsbaustein dargestellt und dieser anschließend an das sekundäre Amin der Seitenkette des Inhibitors geknüpft werden sollte. Die Markierungsvorstufen für die Anbindung des  $^{18}\text{F}$ Fluorethylierungsbausteins entsprechen somit den Referenzsubstanzen der Iodmarkierung **CKIA** und **CKIB**. Damit verringert sich der Synthesaufwand, da keine neuen Markierungsvorstufen in aufwendigen Syntheserouten hergestellt werden müssen. Die Darstellung der Referenzsubstanzen sollte ursprünglich ausgehend von den bereits fluorethylierten Seitenketten **9** und **10** erfolgen. Allerdings konnte die Einführung dieser Seitenketten, wie bereits in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, nicht realisiert werden. Daher musste eine neue Strategie der Darstellung entwickelt werden. Dazu wurden zunächst die Referenzsubstanzen der Iodmarkierung, **CKIA** und **CKIB**, dargestellt und diese durch Fluorethylierung mit 1-Brom-2-fluorethan in die Referenzen **CKIC** und **CKID** umgesetzt (Abbildung 60).

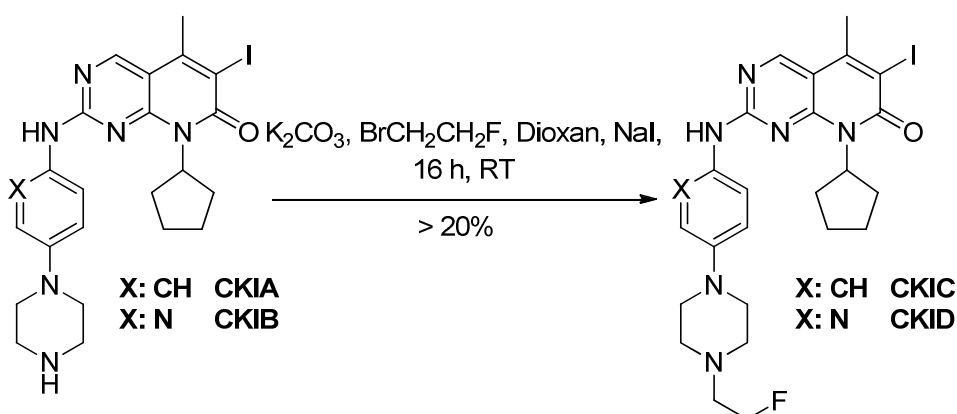
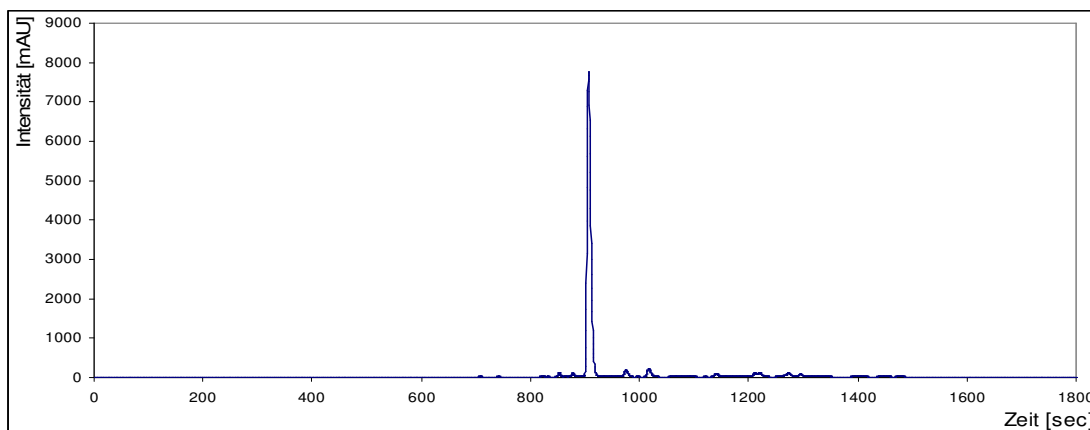


Abbildung 60: Darstellung der Referenzsubstanzen CKIC und CKID

Die Bedingungen der Einführung der Fluorethylgruppe in die Seitenkette (nach Piel *et al.* [164]) wurden für die Darstellung der Referenzsubstanzen übernommen. Die Ausbeuten der Umsetzung sind geringer; verglichen mit den erzielten Ausbeuten der Seitenkettenfluorethylierung (**CKIC**: 20% statt **5**: 54%; **CKID**: 31% statt **6**: 52%). Im Reaktionsgemisch der Umsetzung der Referenzsubstanzen konnte nach Reaktion über Nacht im Massenspektrum kein Signal der Edukte mehr detektiert werden.

Die Produkte wurden zunächst mittels Säulenchromatographie (Normalphasenkieselgel, 5% MeOH in Chloroform) gereinigt. Allerdings wurde bei HPLC-Analyse der Produkte eine Verunreinigung von 15-25% festgestellt. Um diese abzutrennen, war es nötig eine säulenchromatographische Trennung unter

Verwendung von RP-18 Kieselgel (MeCN/H<sub>2</sub>O) mit Gradientenelution (1:4 - 1:1) durchzuführen. Das Lösungsmittel der Produktfraktionen wurde mittels Rotationsverdampfer auf ein Minimum reduziert und das Produkt anschließend im Vakuum getrocknet. Eine anschließend durchgeführte HPLC-Analyse des Produkts bestätigte die hohe Reinheit von jeweils >97% (Abbildung 61).



**Abbildung 61: Analytisches HPLC-UV-Chromatogram der Verbindung CKIC**

Die Struktur der Produkte wurde mittels MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>19</sup>F-NMR und <sup>13</sup>C-NMR aufgeklärt. Die Aufspaltung der Signale der Protonen der Fluorethylkette im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum konnte erneut festgestellt werden (siehe Darstellung der fluorethylierten Seitenketten 3.2.2). Es wurden ähnliche Kopplungskonstanten der geminalen H-C-F-Bindungen detektiert (<sup>2</sup>J = 48 Hz). Die Darstellung im Spektrum ähnelt der im oberen Teil der in Abbildung 50 dargestellten Aufspaltung der Signale der Seitenkette **6**. Die Kopplungskonstanten der vicinalen H-C-C-F-Bindungen konnten nicht gemessen werden, da das Signal mit den Signalen zweier Piperazin-CH<sub>2</sub>-Gruppen überlappt. Aufgrund der schlechten Auflösung der <sup>19</sup>F-NMR-Spektren konnte die Übereinstimmung der Kopplungskonstanten im <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>19</sup>F-NMR Spektrum nicht belegt werden.

### 3.2.6 Synthese der Referenzsubstanz CKIE und der Markierungsvorstufe **24**

Es sollten Verbindungen mit einem Methylketon an Stelle des Iods dargestellt werden, um über fluorethylierte Inhibitoren zu verfügen, deren Lipophilie sich im Bereich der Ausgangsverbindung **CKIA** bewegen. Die Markierungsvorstufe ausgehend vom methylketontragenden Anilinderivat konnte durch Entschützen der Verbindung **23** dargestellt werden (Abbildung 62). Analog der Darstellung von **CKIA/B** wurde **23** bei Raumtemperatur 2 h in einem Gemisch aus 6 M Salzsäure und Dioxan gerührt. Es

konnte erneut eine fast quantitative Abspaltung der Schutzgruppen registriert werden. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt und die Struktur mittels  $^1\text{H}$ -NMR und Massenspektrometrie aufgeklärt.

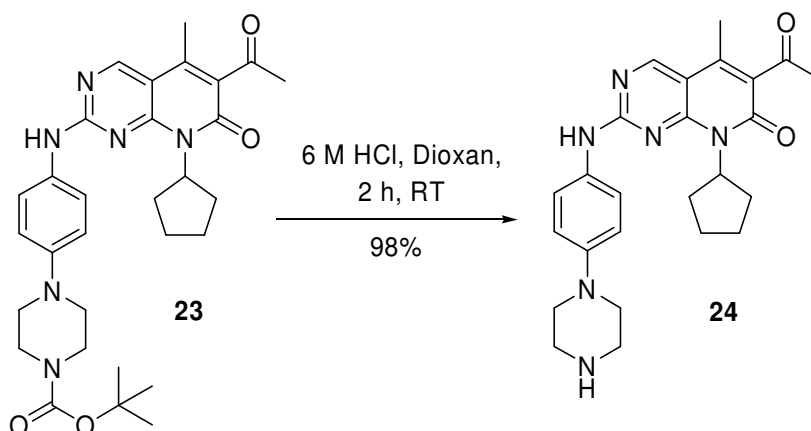


Abbildung 62: Darstellung der Markierungsvorstufe **24** für die Fluorethylierung

Da die Strategie der Einführung einer fluorethylierten Seitenkette bereits bei den Verbindungen **CKIC/D** fehlschlug (vgl. 3.2.5), wurde bei der Darstellung der Referenzsubstanz **CKIE** gleich auf die Strategie der Darstellung der Referenz aus der Markierungsvorstufe zurückgegriffen (Abbildung 63).

Es fanden ebenfalls die bereits bekannten Bedingungen nach Piel *et al.* [164] Anwendung. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie (1. Normalphasenkieselgel, 5% MeOH in Chloroform; 2. RP-18 Kieselgel, MeCN/H<sub>2</sub>O mit Gradientenelution (1:4 - 1:1)) vom Reaktionsgemisch abgetrennt, um eine Reinheit >98% zu erzielen.

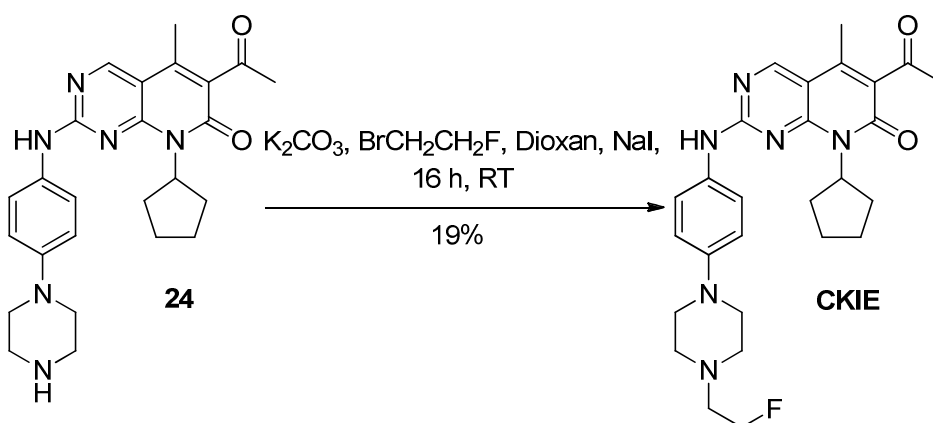


Abbildung 63: Darstellung der Referenzsubstanz **CKIE**

Die Ausbeute ist mit 19% sehr gering. Allerdings konnte ausreichend Substanz für die pharmakologischen Untersuchungen gewonnen werden. Die aufwendige Reinigung mit

Hilfe von zweifacher Säulenchromatographie führt zur Verringerung der Ausbeute, da Fraktionen des ersten Aufarbeitungsschrittes, die mit Nebenprodukten verunreinigt waren, nicht für den zweiten Reinigungsschritt eingesetzt wurden. Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen, um eine höhere Ausbeute zu erzielen, ist sinnvoll, es wurde allerdings aufgrund der geringen Mengen an Ausgangsverbindung darauf verzichtet.

Das Produkt wurde ebenfalls mittels MS,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{19}\text{F}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR identifiziert. Die typische Aufspaltung der Signale der Protonen der Fluorethylkette wurde erneut festgestellt.

### **3.2.7 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung der Referenzsubstanzen mittels FACS<sup>1</sup>**

Eines der Ziele dieser Arbeit ist die Synthese von Verbindungen, die Cdk4/6 inhibieren. Da alle in der vorliegenden Arbeit dargestellten Referenzsubstanzen diese Fähigkeit aufweisen sollen, stellt die Bestimmung der inhibitorischen Wirkung eine wichtige pharmakologische Untersuchung dar. Die Inhibierung der Cdk4/6 geht mit einem Zellzyklusarrest in der  $G_1$ - und  $G_0$ -Phase einher. Daher sollten alle fünf Verbindungen in der Lage sein, den Zellzyklus konzentrationsabhängig zu unterbrechen. Die Wirkung der Verbindungen auf Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus kann mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie bestimmt werden. Dazu werden die Zellen zunächst mit dem Inhibitor und danach mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid versetzt, der mit der DNA der Zellen interkaliert. Die Intensität der Fluoreszenz einer Zelle entspricht der DNA-Konzentration, die in der Zelle vorliegt. Da in der  $G_2/\text{M}$ -Phase im Vergleich zur  $G_1/G_0$ -Phase ein doppelter DNA-Satz vorliegt, kann aus der Intensität der Fluoreszenz auf die Phase des Zellzyklus in der sich die Zelle befindet zurückgeschlossen werden.

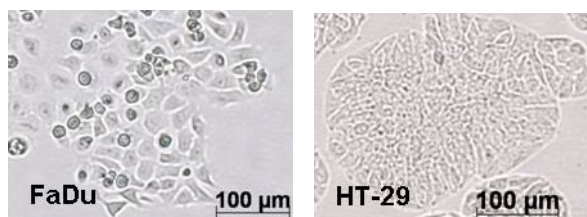
Die Ergebnisse dienen demzufolge als Maß zur Bewertung der inhibitorischen Fähigkeit der einzelnen Verbindungen. Verbindungen mit geringer Wirkung, d.h. bei deren Anwendung kaum/keine Veränderung der Zellzyklusverteilung festgestellt werden kann, werden für Studien wie z.B. der Radiomarkierung der Substanz und radiopharmakologische Evaluierungen nicht weiter verwendet.

Zur Untersuchung wurden Zellen der Zelllinien HT-29 (kolorektales Adenokarzinom) und FaDu (Plattenepithelkarzinom) eingesetzt (Abbildung 64) [166, 167].

---

<sup>1</sup> Die Untersuchung der Zellzyklusverteilung und des Wachstums der Zellen erfolgten durch Frau DC F. Graf und sind in [151, 176] veröffentlicht.





**Abbildung 64: Aufnahmen (Mikroskop) der verwendeten Zelllinien**  
links FaDu, rechts HT-29-Zellen

Alle dargestellten Referenzsubstanzen wurden auf ihren inhibitorischen Effekt auf diese Tumorzellen in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht, indem der Anteil an Zellen beider Zelllinien in der  $G_1/G_0$ -Phase mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde (Tabelle 10). Die Untersuchung der Verbindungen zeigte, dass die Anzahl der HT-29 bzw. FaDu-Zellen in der  $G_1/G_0$ -Phase in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration steigt, während die Zahl der Zellen in S und  $G_2/M$ -Phase abnimmt.

**Tabelle 10: Anteil der Zellen [%] in der  $G_1$ -oder  $G_0$ -Phase 24 h nach Behandlung mit verschiedenen Konzentration der Inhibitoren (n = 8)**

Anteil der Zellen [%] in $G_1$ -Phase					
CKIA [ $\mu\text{mol/l}$ ]	0	0,05	0,1	0,5	1,0
HT-29	45,6 $\pm$ 4,1	62,3 $\pm$ 4,0	68,1 $\pm$ 4,1	90,1 $\pm$ 1,4	89,9 $\pm$ 0,8
FaDU	46,4 $\pm$ 4,7	55,7 $\pm$ 6,5	56,9 $\pm$ 6,5	82,2 $\pm$ 2,5	84,5 $\pm$ 3,1
CKIB [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
HT-29	46,7 $\pm$ 2,4	54,0 $\pm$ 1,5	58,7 $\pm$ 2,7	81,5 $\pm$ 4,9	89,9 $\pm$ 4,3
FaDU	58,6 $\pm$ 3,4	64,7 $\pm$ 3,5	65,8 $\pm$ 5,4	69,4 $\pm$ 6,1	70,7 $\pm$ 3,6
CKIC [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
HT-29	43,1 $\pm$ 3,5	44,5 $\pm$ 2,1	48,7 $\pm$ 3,0	57,7 $\pm$ 4,9	64,3 $\pm$ 7,6
FaDU	46,5 $\pm$ 2,4	45,9 $\pm$ 1,8	45,7 $\pm$ 1,3	50,6 $\pm$ 0,7	54,1 $\pm$ 1,3
CKID [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
HT-29	48,7 $\pm$ 5,8	53,0 $\pm$ 3,9	53,4 $\pm$ 3,6	60,9 $\pm$ 3,1	69,0 $\pm$ 2,6
FaDU	48,1 $\pm$ 4,4	48,3 $\pm$ 2,2	48,9 $\pm$ 3,4	60,0 $\pm$ 2,8	55,3 $\pm$ 5,2
CKIE [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
HT-29	48,1 $\pm$ 4,8	56,8 $\pm$ 3,9	59,4 $\pm$ 6,7	76,2 $\pm$ 8,9	83,0 $\pm$ 4,3
FaDU	45,9 $\pm$ 6,8	50,5 $\pm$ 7,0	53,2 $\pm$ 8,8	67,5 $\pm$ 2,9	78,8 $\pm$ 4,2

Die beiden Verbindungen **CKIA** und **CKIB** zeigen einen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus. Die Wirkung von **CKIA** ist im Vergleich zum **CKIB** erhöht, eine niedrigere Konzentration ist für den G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Arrest ausreichend. Bereits nach 24 h Inkubation der Tumorzellen mit 0,5 µmol/l **CKIA** befanden sich 90% der HT-29-Zellen bzw. 85% der FaDu-Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Damit befinden sich nach Einwirkung von 1 µmol/l **CKIA** über 24 h 44% (HT-29) bzw 38% (FaDu) mehr Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase, als bei der Inkubation ohne Inhibitor.

Um mit **CKIB** ähnliche Werte zu erzielen, muss eine Konzentration von 1,0 µmol/l eingesetzt werden. Nach 24 h liegen dann 90% der HT-29-Zellen, aber nur 71% der FaDu-Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase vor. Es liegen damit 38% (HT-29) bzw. 12% (FaDu) mehr Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase vor.

**CKIE** zeigt eine ähnlich gute inhibitorische Wirkung wie **CKIA** und **CKIB**. Nach der 24-stündigen Inkubation der HT-29 Zellen mit 1 µmol/l **CKIE** befinden sich 83% der Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase, bei Verwendung der FaDu-Zelllinie liegen anschließend 79% der Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase vor. Das entspricht einem Anstieg der Zellzahl in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase von jeweils ca. 35%.

Die beiden Verbindungen **CKIC** und **CKID** zeigen eine wesentlich geringere Hemmung des Zellzykluses bei einer Inhibitorkonzentration von 1 µmol/l als die iodierten Verbindungen. Nach 24 h befinden sich bei Einwirkung von 1 µmol/l **CKIC** 64% der HT-29- und 54% der FaDu-Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, was einem Anstieg von 21% (HT-29) bzw. 8% (FaDu) der Anzahl an Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase im Vergleich zur Kontrolle darstellt. Unter Einwirkung von 1 µmol/l **CKID** befinden sich nach 24 h 69% der HT-29- und 55% der FaDu-Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Der Anstieg der Zellzahl in der G<sub>1</sub>-Phase entspricht dem der mit **CKIC** erzielt wird.

Der Effekt von **CKIA** auf die Verteilung der Zellzyklusphasen ist demzufolge am höchsten, nichtsdestotrotz ermöglichen die Verbindungen **CKIB/E** den Zellzyklusarrest der HT-29 Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase. Die Verbindungen **CKIC/D** zeigen selbst bei einer hohen Inhibitorkonzentration nur einen geringen Einfluss auf die Zellen, die Anzahl der Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase erhöht sich z.B. im Fall der verwendeten FaDu-Zelllinie nur um max. 8% [168].

Für die molekulare Charakterisierung von Tumoren sind Verbindungen notwendig, die hochselektiv mit einem sehr niedrigen IC<sub>50</sub>-Wert an das entsprechende Target binden. Diese Bindung resultiert dann in der Inhibierung des Targets, im vorliegenden Fall einem Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase und einer Verminderung der Anzahl der Zellen in den folgenden Phasen des Zellzyklus. Die durchgeführten Experimente belegen die biologische Wirksamkeit der einzelnen Inhibitoren. Je nach Struktur ist

diese jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Die beiden Verbindungen **CKIC** und **CKID** weisen eine sehr schwache inhibitorische Wirkung auf, es kann kein Zellzyklusarrest festgestellt werden. Die Verbindungen **CKIA/B/E** hingegen belegen, dass ein Zellzyklusarrest unter Einwirkung der Inhibitoren erreichbar ist.

Die Durchflusszytometrie eignet sich im Vergleich zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Werts sehr gut zur Beurteilung der Wirkung als Inhibitor, da nicht nur die Interaktion mit dem Zielenzym betrachtet wird, sondern zusätzlich die Zellaufnahme. Eine Verbindung, die z.B. einen sehr niedrigen  $IC_{50}$ -Wert ausweist, aber nicht in die Zelle aufgenommen wird, eignet sich nicht zur *in vivo*-Anwendung als Radiotracer. Die Ergebnisse spiegeln daher neben der eigentlichen Inhibierung des Enzyms auch die Zellaufnahme wider und geben so einen umfassenderen Überblick über die Wirkung der einzelnen Verbindung.

Die FACS-Analysen wurden genutzt, um die biologische Wirksamkeit der Verbindungen zu überprüfen. Anhand der Ergebnisse ist es möglich, eine Vorauswahl zu treffen, welche Verbindungen das Potential besitzen, sich *in vivo* in stark proliferierenden Zellen anzureichern. Die hohe Wirksamkeit von **CKIA** und **CKIB** sowie der fluorierten Verbindung **CKIE** spricht für den Ansatz, dass mit radiomarkierten Cdk4-Inhibitoren mit Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Grundgerüst die molekulare Charakterisierung von Tumoren möglich ist. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sind die Verbindungen **CKIC** und **CKID** für weiterführende Untersuchungen nicht geeignet.

Die weiteren Untersuchungen zur Radiomarkierbarkeit sowie anschließende radiopharmakologische Evaluation fanden also an den Verbindungen **CKIA**, **CKIB** und **CKIE** statt.

### 3.3 Untersuchungen zur radioaktiven Markierung

#### 3.3.1 Vorbetrachtungen

##### Vorbereitung und Lagerung der Markierungsvorstufen

Die Markierungsvorläufer der Radioiodierung wurden in Portionen von 50-250 µg in fest verschließbare Glasvials unter Argonatmosphäre abgepackt und bei -70 °C gelagert, um mögliche Zersetzungen dieser empfindlichen Stannylverbindungen zu

vermeiden. Direkt vor der Markierung wurden sie nach Erreichen der Raumtemperatur in 50 µl DMSO gelöst und mit 50 µl Methanol (5% Eisessig) verdünnt.

Die Markierungsvorläufer der Radiofluorierung wurden in fest verschließbare Glasvials unter Argonatmosphäre abgepackt und bei -4°C gelagert. Direkt vor der Markierung (nach Erreichen der Raumtemperatur) wurde die entsprechende Menge in ein konisches Reaktionsgefäß (2-3 ml Gesamtvolumen) eingewogen.

### Vorbereitung der [ $^{124}\text{I}$ ]NaI-Lösung

Das Radionuklid  $^{124}\text{I}$  wurde als [ $^{124}\text{I}$ ]NaI-Lösung (50-300 MBq, 100-500 µl) in 0,1 M NaOH von der Firma QSA Global in Braunschweig bezogen. Die Synthese des  $^{124}\text{I}$  erfolgte über die  $^{124}\text{Te}(\text{p},\text{n})^{124}\text{I}$ -Reaktion am Zyklotron MGC-20<sup>2</sup> (Ritverc, Russland) bzw. über die  $^{124}\text{Te}(\text{d},2\text{n})^{124}\text{I}$ -Reaktion am Zyklotron CV 28 (Universitätsklinikum Essen, Deutschland). Für die Radioiodierungen wurde ein entsprechendes Aliquot der [ $^{124}\text{I}$ ]NaI-Lösung (ca. 10 µl) entnommen, so dass die für die jeweilige Markierung gewünschte Aktivitätsmenge vorlag. Vor der Durchführung der Optimierungsversuche wurde die erhaltene [ $^{124}\text{I}$ ]NaI-Lösung mit dest. Wasser so verdünnt, dass eine Aktivitätsmenge von ca. 0,2 MBq/µl erhalten wurde. Von dieser wässrigen Lösung wurden bei allen Radioiodierungen ca. 10 µl eingesetzt.

### Vorbereitung der [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid-Lösung

Die verwendete radioaktive [ $^{18}\text{F}$ ]Fluoridlösung wurde am Zyklotron des Instituts durch Bestrahlung von mit  $^{18}\text{O}$ -angereichertem [ $^{18}\text{O}$ ]H<sub>2</sub>O hergestellt. Die Nukleophilie des Fluorids ist in wässriger Umgebung durch die Ausbildung von Solvathüllen reduziert [169]. Markierungsreaktionen laufen in Gegenwart von aziden Protonen nicht oder nur sehr schlecht ab und müssen deshalb in wasserfreien Lösungsmitteln durchgeführt werden. Um wasserfrei arbeiten zu können, ist es notwendig, das [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid zu Beginn der Synthesen vom Targetwasser zu trennen. In manuellen Synthesen sowie in den Modulsynthesen erfolgt das mittels einer Anionentauscherkartusche. Das [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid-haltige Targetwasser wird über die Anionentauscherkartusche gegeben, wobei das Fluorid auf dem Austauscher der Kartusche adsorbiert bleibt, während das [ $^{18}\text{O}$ ]H<sub>2</sub>O abgetrennt wird. Mit Hilfe einer Lösung aus Kryptofix®<sub>2.2.2</sub> und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in wässrigem Acetonitril kann das [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid anschließend als Kryptofix®- [ $^{18}\text{F}$ ]KF-Komplex von der Kartusche in ein Reaktionsgefäß eluiert werden. Das restliche Wasser dieser Lösung muss durch azeotrope Destillation mit Acetonitril im Stickstoffstrom (bei der Modulsynthese zusätzlich Destillation unter Vakuum)

---

<sup>2</sup> Persönliche Mitteilung des Ritverc-Supports, Herr A. Rogozev.

vollständig entfernt werden, da noch vorhandenes Wasser die Ausbeute der nachfolgenden Fluorierung stark verringert. Die Komplexierung der Kaliumionen mit Hilfe des Phasentransferkatalysators Kryptofix®<sub>2.2.2</sub> ist notwendig, um zum einen hoch reaktives „nacktes“ Fluorid zu erhalten und zum anderen, um dessen Löslichkeit im organischen Lösungsmittel zu verbessern [170].

### **Identifizierung der radiomarkierten Verbindungen**

Aufgrund der bereits angesprochenen sehr geringen Stoffmenge des Produkts, die im Ergebnis radioaktiver Markierungen erhalten wird und der geringen Halbwertszeit der verwendeten Radionuklide ist es nicht möglich, die herkömmlichen Analysemethoden zur Produktcharakterisierung zu nutzen. Die einzigen Möglichkeiten in der Routinearbeit zur Produktcharakterisierung bieten chromatographische Systeme, wie die analytische HPLC mit einem Radioaktivitätsdetektor und die Radio-DC. Die erhaltenen  $R_f$ -Werte und Retentionszeiten der Produkte müssen mit denen der nicht radioaktiven Referenzsubstanzen übereinstimmen.

Die Identifizierung aller radioaktiv markierten Produkte erfolgte daher, soweit möglich, mittels Radio-HPLC und Radio-DC unter den zuvor mit den nicht radioaktiven Standardverbindungen ermittelten Bedingungen.

### **Radio-HPLC**

Um eine sichere Identifizierung zu gewährleisten, wurde zusätzlich zur Untersuchung der radioaktiven Reaktionslösung stets eine Untersuchung mit zugesetzter Referenzsubstanz durchgeführt und der so erhaltene Peak im UV-Chromatogramm dem im Radioaktivitätschromatogramm zugeordnet. Da die zu untersuchende Probe zuerst den UV-Detektor und erst anschließend den Radioaktivitätsdetektor passiert, kommt es zur Verschiebung der Retentionszeiten im UV- und Radioaktivitätschromatogramm von ca. 0,2 min.

Die Retentionszeiten der radiomarkierten Verbindungen (RP-18, Acetonitril/Wasser je 0,1% TFA; vgl. 6.2.6) gibt Tabelle 11 an.

Die Bestimmung der radiochemischen Reinheit (RCR) erfolgte mittels Auswertung der Radioaktivitätschromatogramme der DC oder der HPLC und spiegelt den prozentualen Anteil der Aktivität des Produkts zur Gesamtaktivität der Probe wider. Die radiochemische Ausbeute (RCA) bezieht sich auf die Startaktivität an [<sup>124</sup>I]NaI und [<sup>18</sup>F]Fluorid und wurde, wenn nicht anders deklariert, zerfallskorrigiert angegeben.

**Tabelle 11: Retentionszeiten der radiomarkierten Verbindungen**

Verbindung	Retentionszeit [min]
	Radioaktivitätsdetektor
[ <sup>124</sup> I]29	14,7
[ <sup>124</sup> I]CKIA	5,9
[ <sup>124</sup> I]30	11,9
[ <sup>124</sup> I]CKIB	4,2
[ <sup>18</sup> F]BFE	9,1
[ <sup>18</sup> F]FETos	16,4
[ <sup>18</sup> F]CKIE	6,8

### Radio-DC

Zur Entwicklung der Radio-DCs wurde Petrolether/Ethylacetat (1:1) als Laufmittelgemisch unter Verwendung von Kieselgel-60-Platten mit Fluoreszenzindikator genutzt. Für die Iodierungsexperimente wurde ein Rf-Wert von 0,04 für [<sup>124</sup>I]NaI und von 0,54 für das noch nicht entschützte Produkt [<sup>124</sup>I]29 bestimmt. Für die Markierung mit <sup>18</sup>F wurde ein Rf-Wert von 0,00 für [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> und 0,87 für [<sup>18</sup>F]FETos bestimmt. Die Analyse des [<sup>18</sup>F]BFE konnte aufgrund der Flüchtigkeit der Verbindung nicht mit Hilfe der DC durchgeführt werden.

### 3.3.2 Darstellung von [<sup>124</sup>I]CKIA

Die Radioiodierung von organischen Molekülen kann, wie bereits in 1.6.2 beschrieben, über elektrophile und nukleophile Substitution erfolgen. Die nukleophile Substitution kann durch den Austausch eines stabilen Iod- oder Bromisotops durch das Radioiod realisiert werden, bedarf allerdings hoher Reaktionstemperaturen. Diese Syntheseroute führt häufig zur Zersetzung des Produkts bzw. der Markierungsvorstufe und ist im Fall des Iodisotopenaustauschs mit einer geringen spezifischen Aktivität verbunden.

Um solche Zersetzungsprozesse zu vermeiden, sollten für die Einführung von <sup>124</sup>I in die Position 6 des Pyrido[2,3-*d*]pyrimidins daher die milden Bedingungen einer elektrophilen Substitution durch regioselektive Destannylierung Anwendung finden.

Radioiodierungen unter Destannylierung führen zu hohen Ausbeuten und hohen spezifischen Aktivitäten verbunden mit einem geringen experimentellen Aufwand. Um das gewünschte radioiodierte Produkt zu erhalten, wird die Trimethylstannylmarkierungsvorstufe zunächst in Gegenwart eines milden Oxidationsmittels (OM) mit [<sup>124</sup>I]NaI umgesetzt. Die Boc-Schutzgruppe des Produkts

[<sup>124</sup>I]29 wird anschließend unter Einwirkung von TFA abgespalten und dabei wird [<sup>124</sup>I]CKIA erhalten. Abbildung 65 zeigt den generellen Reaktionsablauf.

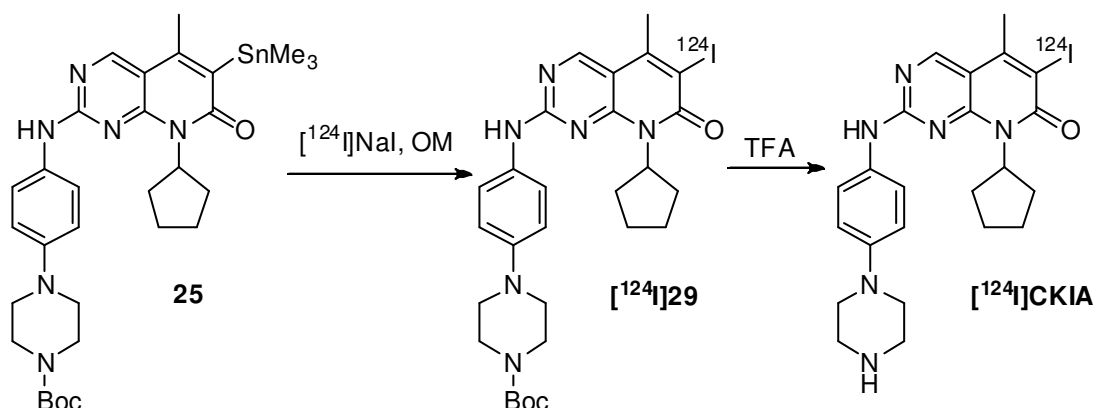


Abbildung 65: Zweistufige Darstellung von [<sup>124</sup>I]CKIA aus der Markierungsvorstufe 25

Für die Radiomarkierungen wurden Iodobeads und Iodogen als Oxidationsmittel zur *in situ*-Erzeugung der reaktiven I<sup>+</sup>-Spezies eingesetzt. Diese beiden, sehr gebräuchlichen Oxidationsmittel können im Fall des Chloramin-T polymergebunden als Iodobeads<sup>TM</sup> und im Fall des Iodogens als beschichtete Röhrchen (Iodotubes<sup>TM</sup>) erworben werden (vgl. 1.6.2).

Der Einsatz der Iodobeads<sup>TM</sup> anstelle von Chloramin-T-Pulver vereint mehrere Vorteile. Zum einen ist die Abtrennung des Oxidationsmittels nach Beendigung der Reaktion einfach, da es völlig ausreicht, die Polymerkugel aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Die Reaktion wird dadurch sofort gestoppt, die Zugabe eines Reduktionsmittels ist nicht mehr nötig. Zum anderen erlaubt die schonende Oxidation im Zweiphasensystem die Umsetzung empfindlicher Markierungsvorstufen.

Der Einsatz von Iodotubes<sup>TM</sup> ist vor allem bei der Markierung von Peptiden und Proteinen in wässrigen Medien zu empfehlen. Das wasserunlösliche Iodogen ist als Film auf der Glasinnenwand der Röhrchen, vergleichbar mit einem Reagenzglas, abgeschieden, die Oxidation findet also ebenfalls an der Phasengrenze statt. Wird im wässrigen Medium gearbeitet, reicht es völlig aus die Reaktionslösung in ein anderes Gefäß umzufüllen, um die Reaktion zu stoppen. Das Iodogen verbleibt auf der Glaswand und die Bildung der reaktiven Iodspezies ist unterbunden.

Bei der Radioiodierung im organischen Lösungsmittel ist der Einsatz eines Reduktionsmittels wie Natriumhydrogensulfit unumgänglich, um die reaktive I<sup>+</sup>-Spezies zum Iodid zu reduzieren. Das Iodogen löst sich ebenfalls im organischen Lösungsmittel und wird nicht durch Überführung der Lösung in ein anderes Gefäß abgetrennt.

### Radioiodierung

Die Radioiodierung der Markierungsvorstufe **25** zum [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA wurde zunächst auf kleinem Aktivitätsniveau optimiert. Dabei standen die Mengen an Markierungsvorstufe und die Wahl des Oxidationsmittels im Fokus der Untersuchung. Für die Markierungsuntersuchungen fand eine Aktivitätsmenge von 2-3 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]NaI Verwendung. Die Markierungen wurden folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurde ein Aliquot Markierungsvorstufe (20-200  $\mu\text{g}$ ) aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht, in 50  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst und mit 5%igem Eisessig in Methanol verdünnt. Da sich die Vorstufe nicht im Reaktionsmedium, dem Methanol-Eisessiggemisch löst, musste DMSO als Lösungsvermittler eingesetzt werden. In der Literatur findet DMSO häufig bei der Radioiodierung Einsatz, da es die Effizienz der Radiomarkierung erhöhen soll [171].

Die Markierungsvorstufe (MV) wurde entweder in ein *loBind*-Eppendorfvial, indem sich 1-2 Iodobeads<sup>TM</sup> befanden, oder direkt in das Iodotube<sup>TM</sup> überführt und das Glasvial mit 50  $\mu\text{l}$  5%igem Eisessig in Methanol nachgespült, so dass ein Reaktionsvolumen von 150  $\mu\text{l}$  vorlag. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der [ $^{124}\text{I}$ ]NaI-Lösung direkt zur Lösung der Markierungsvorstufe. Das Reaktionsgemisch wurde für 10-30 min bei Raumtemperatur im Thermomixer geschüttelt und die Umsatzrate der Reaktion durch DC-Analyse eines Aliquots nach 10, 20 und 30 min bestimmt. Tabelle 12 fasst die Ergebnisse der einzelnen Optimierungsschritte zusammen.

**Tabelle 12: Optimierung der Radioiodierung bei Raumtemperatur**

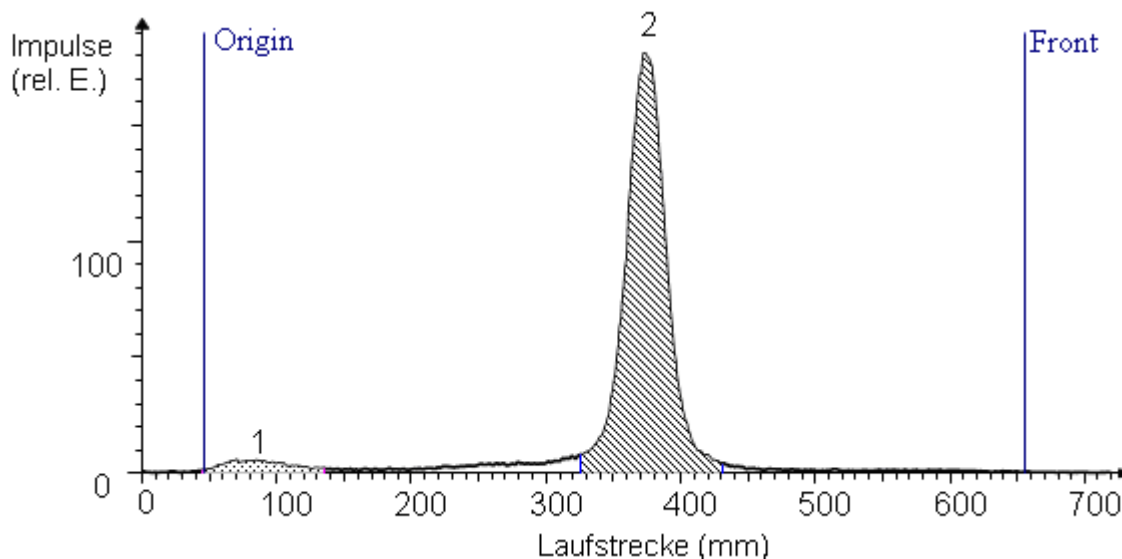
Lf. Nr.	Menge MV* [ $\mu\text{g}$ ]	Oxidationsmittel	Anteil Produkt [%] laut Radio-DC		
			10 min	20 min	30 min
1	20	1 Iodobead <sup>TM</sup>	18	20	30
2	40	1 Iodobead <sup>TM</sup>	58	58	70
3	50	1 Iodobead <sup>TM</sup>	55	58	80
4	60	2 Iodobeads <sup>TM</sup>	40	52	64
5	100	1 Iodobead <sup>TM</sup>	82	89	94
6	100	2 Iodobeads <sup>TM</sup>	56	81	91
7	200	1 Iodobead <sup>TM</sup>	90	93	95
8	40	Iodotube <sup>TM</sup>	20	25	80

\* Markierungsvorstufe

Die radiochemische Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsgemische wurde mittels Radio-DC untersucht. Abbildung 66 zeigt die Auswertung einer dieser Radio-DC-Analysen des Reaktionsgemischs. Es zeigte sich, dass bei der



Radiomarkierung unter den angewendeten Bedingungen die Bildung von Nebenprodukten ausbleibt.



**Abbildung 66: Auswertung einer Radio-DC** 1) freies [ $^{124}\text{I}$ ]iodid, 2) [ $^{124}\text{I}$ ]29

Die Ergebnisse der Optimierung (Tabelle 12) zeigen eindeutig, dass die Menge an Markierungsvorstufe einen großen Einfluss auf die Umsetzungsrate hat. Beim Einsatz von 20  $\mu\text{g}$  MV (lf. Nr. 1) wurde nach 30 min nur geringe Ausbeuten von 30% erhalten werden. Bei dem Einsatz höherer MV-Mengen (lf. Nr. 2/3) konnten wesentlich höhere Ausbeuten von 70% bzw. 80% erzielt werden. Davon ausgehend wird ein Minimum von 40  $\mu\text{g}$  MV für die Radiosynthese benötigt. Eine weitere Steigerung der Menge an MV brachte eine höhere radiochemische Ausbeute. Beim Einsatz von 100  $\mu\text{g}$  erhält man bereits nach 10 min 82% Ausbeute, der Einsatz von 200  $\mu\text{g}$  MV erzielt sogar 90%. Die radiochemische Ausbeute stieg mit der Zeit weiter an, sodass nach 30 min 95% Produkt im Reaktionsgemisch vorlagen. Der Einsatz einer größeren Menge Oxidationsmittel brachte keine weitere Steigerung, wie die Versuche 4 und 6 zeigten. Neben den Iodobeads<sup>TM</sup> fanden auch die Iodotubes<sup>TM</sup> in den Optimierungsversuchen Einsatz. Die Untersuchung 8 im Vergleich zu 2 zeigt, dass die Ausbeute bei Einsatz von 40  $\mu\text{g}$  MV in einem Iodotube<sup>TM</sup> nach 10 min geringer ist als bei Einsatz eines Iodobeads<sup>TM</sup>. Die Reaktion scheint langsamer abzulaufen als beim Einsatz der Iodobeads<sup>TM</sup>. Die Ausbeute bleibt die ersten 20 min ungefähr gleich, steigt aber nach 30 min auf 80% an und übertrifft somit die mit einem Iodobead<sup>TM</sup> erzeugte Ausbeute von 70% (2).

Die erst geringe Ausbeute im Vergleich zu den Iodobeads<sup>TM</sup> liegt womöglich an einer unzureichenden Vermischung. Bei Einsatz der Iodobeads<sup>TM</sup> im *loBind*-Eppendorf-Vial kann sich das Oxidationsmittel frei durch die Lösungsmittelphase bewegen, im Fall der

Iodotubes™ ist das Oxidationsmittel fest auf dem Glasboden aufgebracht. Die *IoBind*-Eppendorf-Vials passen sehr gut in die Öffnungen des Thermomixers und werden somit während der Reaktion gut geschüttelt, was die Durchmischung noch verbessert. Das Reaktionsgemisch im Glasvial der Iodotubes™ muss aufgrund der Größe des Iodotubes™ während der Reaktion manuell durchmischt werden. Der Anstieg der Ausbeute nach 20 min lässt sich womöglich auch durch die Löslichkeit des Iodogens erklären. Da die Reaktion in organischem Lösungsmittel durchgeführt wurde, besteht die Möglichkeit, dass das Iodogen™ gelöst wurde und somit kein Zweiphasensystem mehr vorliegt. Die dann vorliegende homogene Verteilung im Reaktionsgemisch fördert eine schneller/besser ablaufende Reaktion.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich das Iodogen im Reaktionsgemisch befindet bzw. dass sich Chloramin-T vom Polymer löst und frei im Reaktionsgemisch vorliegt, wurden alle Reaktionen durch Zugabe von 50 µl gesättigter Natriumhydrogensulfid-Lösung als Reduktionsmittel beendet. Die optimalen Bedingungen der Inkorporation von  $^{124}\text{I}$  sind in Tabelle 14 dargestellt.

### Abspaltung der Schutzgruppe

Nach Optimierung der Inkorporation des Radioiods bestand die Notwendigkeit, die Entfernung der Boc-Schutzgruppe zu untersuchen. Die Abspaltung erfolgte im stark sauren Medium durch Zugabe von 200 µl TFA. Nach einer Reaktionszeit von 20 min wurde ein Aliquot des Reaktionsgemischs entnommen und mittels analytischem HPLC-System untersucht. In ersten Versuchen erfolgte die Entschützung bei 50 °C, wobei sich eine fast vollständige Umsetzung nach 20 min zeigte. Es wurde weniger als 10% unumgesetztes [ $^{124}\text{I}$ ]29 detektiert. Im Reaktionsgemisch lagen neben dem Produkt [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA (45-65% Anteil) und dem [ $^{124}\text{I}$ ]29 noch 4 weitere Nebenprodukte vor, die einen Gesamtanteil von bis zu 40% ausmachten. Die erhaltenen Nebenprodukte wurden nicht weiter charakterisiert.

Versuche, die Ausbeute der Schutzgruppenabspaltung durch Erhöhung der Temperatur auf 90 °C zu verbessern, schlugen fehl. Im Reaktionsgemisch lag nach 20 min zwar kein [ $^{124}\text{I}$ ]29 mehr vor, allerdings konnten bis zu 10 Nebenprodukte festgestellt werden. Die Ausbeute an [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA betrug ca. 40% und ist damit mit der Ausbeute einer Synthese bei 50 °C vergleichbar.

Eine Erhöhung der Temperatur ist nicht zu empfehlen, da die Aufarbeitung durch die hohe Anzahl an Nebenprodukten wesentlich erschwert wird. Diese ließen sich sehr schlecht vom gewünschten Produkt abtrennen. Eine Verringerung der Reaktionstemperatur zur Vermeidung der Bildung der Nebenprodukte brachte keine

Vorteile. So konnte zwar eine geringe Anzahl an Nebenprodukten beobachtet werden, allerdings konnte auch nur eine geringe Entschützungsrate festgestellt werden. Nach 20 min lagen nur 13% [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA im Reaktionsgemisch vor. Diese geringe Ausbeute ließ sich auch durch Verlängerung der Inkubationszeit nur unwesentlich verbessern. Die Ergebnisse der Optimierung der Schutzgruppenabspaltung sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13: Untersuchung zur Entschützung von [ $^{124}\text{I}$ ]29 mit TFA**

Verbindung	RCA [%]		
	25 °C	50 °C	90 °C
[ $^{124}\text{I}$ ]CKIA	13%	45-65%	60%
[ $^{124}\text{I}$ ]29	80%	≤10%	0%
Nebenprodukte	7%	≤40%	40%
Anzahl an Nebenprodukten	2	4	10

Die Umsetzung bei 50 °C scheint die beste Möglichkeit zu sein, um eine ausreichende Ausbeute bei der Abspaltung der Schutzgruppe zu erhalten. Die Anzahl der entstehenden Nebenprodukte erlaubt die saubere Abtrennung des Produkts mittels semipräparativer HPLC. Die Ausbeute der Entschützung bei Raumtemperatur, verbunden mit einer geringen Nebenproduktbildung, hätte eventuell durch eine größere Menge an TFA erhöht werden können. Tabelle 14 fasst die optimalen Bedingungen der Radiosynthese im geringen Aktivitätsniveau zusammen.

**Tabelle 14: optimale Bedingungen zur Darstellung von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA bei geringen Aktivitätsniveau**

$^{124}\text{I}$ -Inkorporation:	100-200 µg <b>25</b> , 50 µl DMSO, 100 µl Methanol (5% Eisessig), 10 µl [ $^{124}\text{I}$ ]NaI in ca. 0,1 M NaOH, RT, 10 min, 1 Iodobead™
Entschützung:	200 µl TFA, 50 °C, 20 min

### Übertragung der Reaktionsbedingungen auf einen präparativen Synthesemaßstab

Für die biologischen Untersuchungen war es notwendig, 10-40 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA herzustellen. Für die entsprechenden Radiosynthesen im größeren Maßstab wurde daher von ca. 40 MBq bis maximal 275 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]NaI je Synthese ausgegangen. Damit die Ausbeute der Radiosynthese nicht aufgrund einer zu geringen Konzentration der Markierungsvorstufe sinkt, wurden standardmäßig 250 µg **25** eingesetzt.

Beim ersten Versuch der Durchführung nach den Bedingungen der Optimierung wurden unerwartete Probleme bei der Verwendung der Iodobeads™ festgestellt. Ein Großteil der radioaktiv markierten Substanz bleibt nach der Iodierung irreversibel am Iodobead™ gebunden. Wahrscheinlich ist das iodierte Produkt [ $^{124}\text{I}$ ]29 so lipophil, dass es an der Polymerstruktur der Iodobeads™ haftet. Selbst bei Verwendung verschiedenster Lösungsmittel wie DMSO, Ethylacetat oder Methanol konnte [ $^{124}\text{I}$ ]29 nicht vom Iodobead™ getrennt werden. Die Verwendung von Diethylether und Chloroform brachte zwar eine Ablösung, allerdings verbunden mit der Auflösung des Iodobeads™.

Die Verwendung von Iodobeads™ wurde verworfen und eine Verwendung von Iodotubes™ erschien sinnvoll, da die Glaswand des Reaktionsgefäßes das Anhaften der lipophilen Verbindung verhindert. Unter den optimalen Bedingungen, die für die Anwendung der Iodobeads™ entwickelt wurden, wurde unter Verwendung der Iodotubes™ eine hohe Ausbeute von über 90% beobachtet. Die Iodierung wurde durch Überführen des radioaktiven Reaktionsgemischs mittels Pipette in ein *loBind*-Eppendorfial gestoppt. Das Iodotube™ wurde anschließend mit 50 µl Natriumhydrogensulfidlösung gespült, um sämtliches  $\text{I}^+$  zu reduzieren. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte ebenfalls nach den zuvor optimierten Bedingungen.

Bei der Verwendung der Iodotubes™ ist die Reihenfolge der Zugabe für den Erfolg der Reaktion ausschlaggebend. Es ist unbedingt zu beachten, dass erst die Zugabe der Markierungsvorstufe und deren Verdünnung mit Methanol (5% Eisessig) erfolgt und erst anschließend die Zugabe des [ $^{124}\text{I}$ ]NaI. Vertauscht man die Reihenfolge und gibt zuerst die [ $^{124}\text{I}$ ]NaI-Lösung zum Iodogen entsteht ein bisher unidentifiziertes Nebenprodukt (> 60%) und die Bildung des Produkts ist auf ein Minimum (< 5%) reduziert. Ünak *et al.* [139] beschreiben eine mögliche Selbstiodierung des Iodogens, welche die Bildung des Nebenprodukts erklären kann.

### Gesamtsynthese

Von der Übertragung der Synthese auf ein automatisiertes Synthesemodul wurde aufgrund der geringen maximalen Umgangsaktivitäten und der geringen Anzahl derartiger Umsetzungen abgesehen.

Die regelmäßige Synthese zur Herstellung von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA für weiterführende Untersuchungen erfolgte ausgehend von 40-275 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]NaI und 250 µg **25** in 50 µl DMSO verdünnt mit 100 µl 5% Eisessig in Methanol im Iodotube™. Das Iodotube™ wird verschlossen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgefäß sollte für eine optimale Verteilung währenddessen drei-

bis viermal manuell durchmischt werden. Nach 10 min wurde ein Aliquot des Gemischs entnommen und die Ausbeute der Iodierung mittels Radio-DC überprüft. Ist der Anteil an [ $^{124}\text{I}$ ]**29** im Reaktionsgemisch höher als 90% wird die Reaktion durch Überführen des Reaktionsgemischs aus dem Iodotube™ in ein *loBind*-Eppendorf-Vial und Zugabe von Natriumhydrogensulfit beendet.

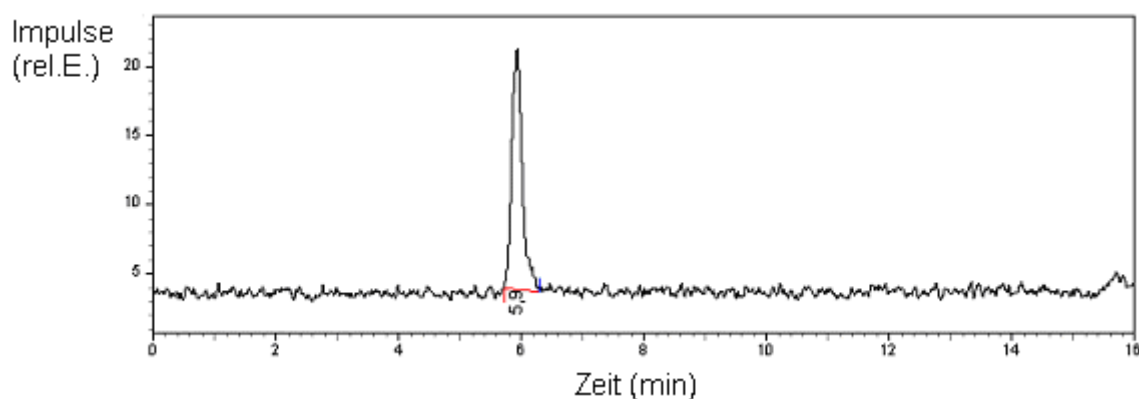
Die Aktivitätsbilanz zeigt, dass kaum radioaktives Produkt im Iodotube™ zurückbleibt (<1 MBq). Anschließend erfolgt die Zugabe von 200 µl TFA, um die Abspaltung der Schutzgruppe einzuleiten. Das *loBind*-Eppendorf-Vial wird fest verschlossen und bei 50 °C für 20 min im Thermomixer zur Reaktion gebracht. Nachdem das Reaktionsgemisch auf unter 30 °C abgekühlt wurde, kann der Fortschritt der Entschützung in einem Aliquot des Reaktionsgemischs mittels analytischer HPLC untersucht werden. Ist der Anteil an Edukt [ $^{124}\text{I}$ ]**29** auf unter 10% gesunken, erfolgt die Reinigung mittels semipräparativer HPLC an einer Supelco Discovery RP-18-Säule (vgl. 6.2.5). Die Produktfraktion (13,2-14,0 min) wird in einem 40 ml Falcon-Tube aufgefangen, mit 20 ml Wasser verdünnt und anschließend über eine Sep Pak C-18 Festphasenkartusche gegeben. Das Produkt bleibt aufgrund von lipophilen Wechselwirkungen auf der Kartusche adsorbiert, das HPLC-Elutionsmittel, ein Gemisch aus Acetonitril und TFA in Wasser kann somit entfernt werden. Die Kartusche wird mit wenig Luft getrocknet und anschließend kann das Produkt mit 1 ml reinem Ethanol quantitativ eluiert werden.

Für radiopharmakologische Untersuchungen an Zellen ist ein Anteil von max. 1% Ethanol und an Mäusen oder Ratten von max. 10% Ethanol in der Injektionslösung tolerierbar<sup>3</sup>. Um diesen Maximalanteil nicht zu überschreiten, musste die Produktfraktion auf maximal 500 µl Ethanol eingeeengt werden. Innerhalb von ungefähr 20 min konnte das Volumen im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur halbiert werden. Das Produkt ist stabil und nicht flüchtig, es kam während des Einengens zu keinem Aktivitätsverlust. Bei Reduktion des Volumens auf ca. 200 µl konnte eine erhöhte Adhäsion des Produkts an der Gefäßwand festgestellt werden, d.h. das Produkt ließ sich nicht mehr aus dem Gefäß entfernen. Daher wurde bei allen Versuchen darauf geachtet, dass das Endvolumen nicht unter 400 µl lag. Um die Zeit des Eindampfens zu verringern, wurde die Elution der Festphasenextraktionskartusche mit Diethylether getestet. Die Kartusche wurde dazu mit 14 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]**CKIA** beladen und anschließend mit 3 ml Diethylether eluiert. Es fanden sich nur 4 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]**CKIA** im Eluat wieder. Das restliche, auf der Kartusche verbliebene [ $^{124}\text{I}$ ]**CKIA** konnte mit Ethanol eluiert werden.

---

<sup>3</sup> gebräuchliche Vorgehensweise am Institut für Radiopharmazie, FZD

Im Ethanol-Eluat fanden sich anschließend 8,5 MBq reines  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  (Abbildung 67), so dass insgesamt 12,5 MBq  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  im vereinigten Eluat vorlagen. Eine Elution mit Diethylether ist daher nicht zu empfehlen. Die Polarität des Diethylethers ist nicht ausreichend, um die Wechselwirkungen des  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  mit der stationären Phase der Kartusche zu überwinden. Ethanol eignet sich besser, da sich das  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  darin besser löst und somit eine effiziente Elution der Kartusche erreicht wird.



**Abbildung 67: Analytisches HPLC-Radiochromatogramm des  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  nach Reinigung mittels HPLC und SPE**

Mit dieser Versuchsdurchführung konnten in einer Beispielsynthese aus 36 MBq  $[^{124}\text{I}]\text{NaI}$  innerhalb von 104 min (inklusive semipräparativer HPLC und Analyse der Einzelschritte) 11,8 MBq  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  (RCA: 33,6%; zerfallskorrigiert) hergestellt werden. Die Synthese des  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  ergab eine durchschnittliche radiochemische Ausbeute von 25% ( $n = 5$ ). Das Produkt wurde mittels HPLC-Co-Injektion mit der Referenzsubstanz identifiziert. Die optimalen Bedingungen für die Darstellung von  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  für weiterführende Experimente fasst Tabelle 15 zusammen.

**Tabelle 15: optimale Bedingungen zur Darstellung von  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  für weiterführende Experimente**

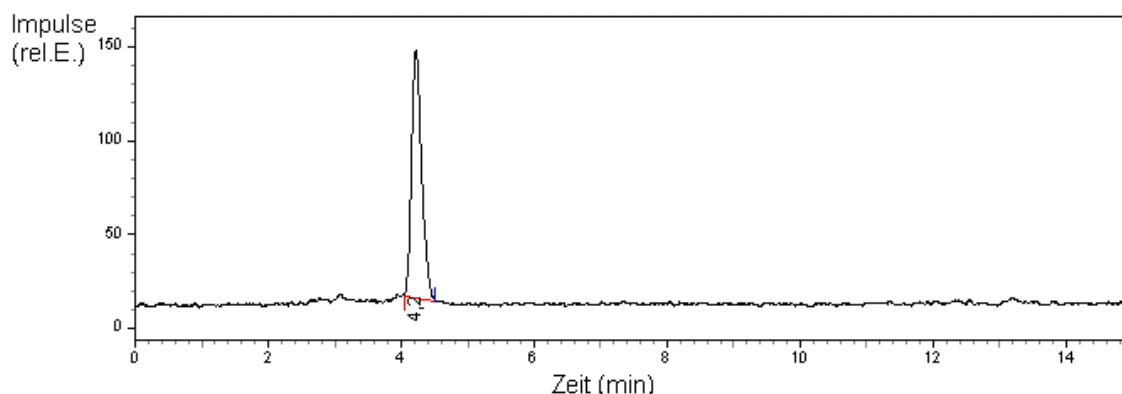
Iod-124 Inkorporation:	250 $\mu\text{g}$ <b>25</b> , 50 $\mu\text{l}$ DMSO, 100 $\mu\text{l}$ Methanol (5% Eisessig), 40-275 MBq $[^{124}\text{I}]\text{NaI}$ in ca. 0,1 M NaOH, RT, 10 min, 1 Iodotube <sup>TM</sup>
Entschützung:	200 $\mu\text{l}$ TFA, 50 °C, 20 min
Reinigung:	Semipräparative HPLC an Supleco Discovery RP-18-Säule (vgl. 6.2.5) und Festphasenextraktion an Sep Pak C-18-Kartusche

### 3.3.3 Darstellung von $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$

Die optimalen Reaktionsbedingungen zur Darstellung von  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  wurden für die Synthese von  $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$  übernommen und nicht weiter optimiert. Die Synthese erfolgte

ausgehend von 250 µg **26** in 50 µl DMSO, verdünnt mit 100 µl Methanol (5% Eisessig) und 28-189 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]NaI. Ausgehend von 186 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]NaI erhält man beispielsweise innerhalb von 107 min (inklusive semipräparativer HPLC und Analyse der Einzelschritte) 32,6 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB (17,8% zerfallskorrigiert).

Die Einführung des  $^{124}\text{I}$  erfolgte ebenfalls mittels Iodotube<sup>TM</sup>, die Einsatzmöglichkeit der Iodobeads<sup>TM</sup> wurde nicht überprüft. Nach 10 min Reaktionszeit wurde die Umsetzungsrate mittels Radio-DC überprüft. Im Fall der vollständigen Umsetzung (über 90% [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB) wurde die Reaktion mit 50 µl Natriumhydrogensulfit-Lösung beendet und in ein *loBind*-Eppendorf-Vial überführt. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte analog den Bedingungen für die Entschützung zum [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA. Das Produkt wurde anschließend ebenfalls über semipräparative HPLC gereinigt. Die Produktfraktion (15,0-16,0 min) wurde im 40-ml Falcon-Tube aufgefangen, mit 20 ml dest. Wasser verdünnt und über eine Sep-Pak-tC-18 Kartusche gegeben. Die Kartusche wurde mit 1 ml Ethanol eluiert und das Eluat im Stickstoffstrom auf ein Volumen von 400-500 µl eingengt.

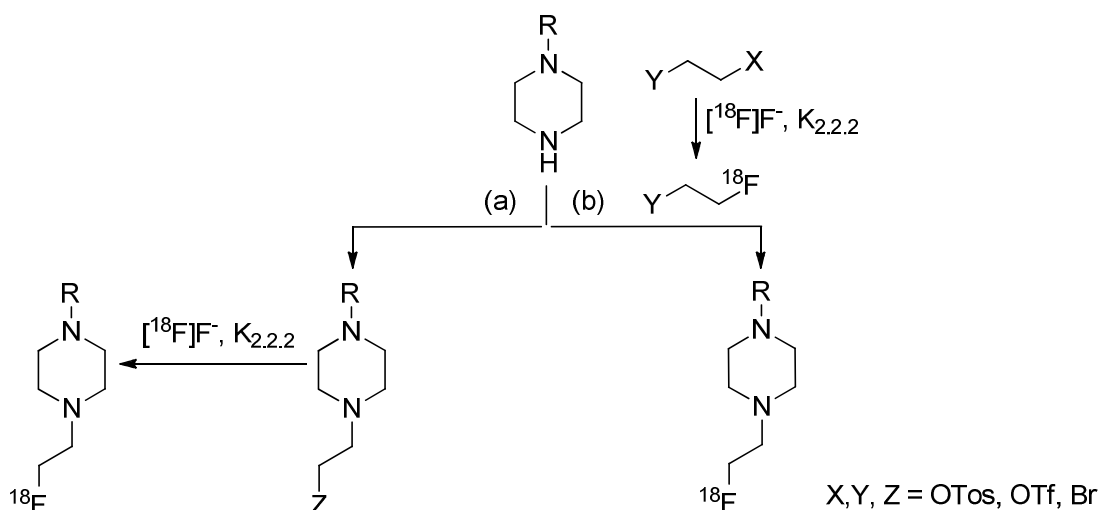


**Abbildung 68:** Analytisches Radio-HPLC-Chromatogramm von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB nach Reinigung mittels HPLC und SPE

Die Verbindung wurde mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit (Abbildung 68) untersucht, die Identifikation erfolgte durch Co-Injektion mit der Referenz.

### 3.3.4 Untersuchungen zur Darstellung $^{18}\text{F}$ -tragender Markierungsbausteine

Für die Darstellung der Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE wurde die Strategie der Fluorethylierung verfolgt. Für die Darstellung fluorethylierter Verbindungen bestehen zwei Möglichkeiten: zum einen die direkte Markierung und zum anderen die indirekte Markierung mit Hilfe prosthetischer Gruppen (Abbildung 69).

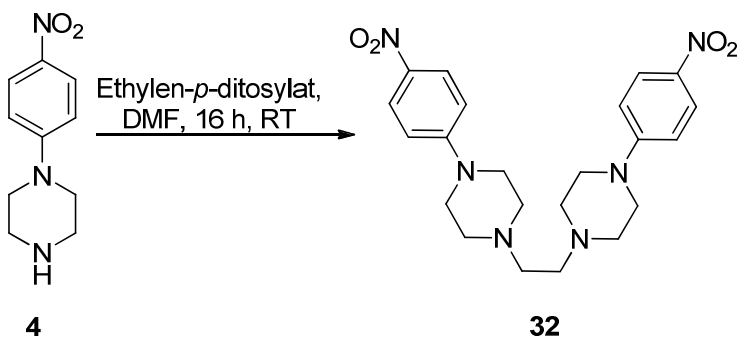


**Abbildung 69:** Einführung des Fluorids in einer Ein-Schritt-Synthese (a) bzw. über die Darstellung einer prosthetischen Gruppe als Zwischenschritt (b)

### 3.3.4.1. Direkte Markierung in einer Ein-Schritt-Synthese

Die Darstellung über den Weg (a) erfordert eine aufwendigere Synthese der Markierungsvorstufe. Es bieten sich zwei Synthesestrategien an, um das gewünschte Produkt darzustellen. Einerseits die Umsetzung mit Ethylen-*p*-ditosylat in einem Reaktionsschritt, andererseits kann der Substituent zunächst zur entsprechenden Ethanolverbindung derivatisiert und anschließend durch Umsetzung mit Toluolsulfonylchlorid in die entsprechende Tosylverbindung umgewandelt werden. Beide Varianten wurden anhand der Modellverbindung 1-(4-Nitrophenyl)piperazin (**4**), die der Seitenkette der Markierungsvorstufe entspricht, untersucht [172].

Die direkte Umsetzung mit Ethylen-*p*-ditosylat in DMF bei Raumtemperatur führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Das entstandene Produkt konnte mittels NMR und MS als das in Abbildung 70 dargestellte, doppelt substituierte Derivat **32** identifiziert werden.



**Abbildung 70:** Umsetzung der Modellverbindung **4** mit Ethylen-*p*-ditosylat führt zu doppelt substituierten Produkt **32** [172]



Die Darstellung des ethanolsubstituierten Produkts **33** (Abbildung 71) durch Umsetzung mit 2-Bromethanol wurde in Aceton unter Zugabe von NaI in Ausbeuten von ca. 64% erzielt. Allerdings schlugen im Anschluss alle Versuche, eine geeignete Abgangsgruppe in das Molekül einzuführen, fehl. Es wurden mehrere Versuche zur Umsetzung der Modellverbindung **33** mit Mesyl- und Tosylchlorid in verschiedenen Lösungsmitteln wie THF und Dichlormethan sowie unter Einsatz verschiedener Basen, wie z.B. Triethylamin oder auch Natriumhydrid und Dimethylaminopyridin durchgeführt. Allerdings konnte bei sämtlichen Reaktionsansätzen kein Produkt isoliert werden. Auch die Einführung der Tosylgruppe unter Steglich-Bedingungen (2,5 äq. Tosylchlorid, 3 äq. Triethylamin und 0,1 äq. Dimethylaminopyridin in Dichlormethan) führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Ein korrespondierendes Propanolderivat ließ sich unter diesen Bedingungen mit einer Ausbeute von 47% in das entsprechende Propyltosylat umwandeln. Eine Erklärung, warum sich das Ethyltosylat **34** nicht darstellen lässt, konnte nicht gefunden werden [172].

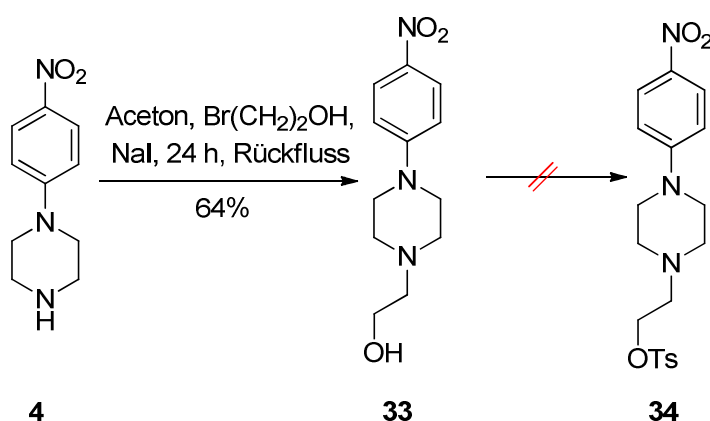


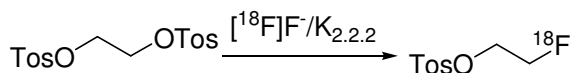
Abbildung 71: Darstellung des Tosylats über eine Zwei-Schritt-Synthese [172]

### 3.3.4.2. Indirekte Markierung in einer Zwei-Schritt-Synthese

Die Untersuchungen zur Markierbarkeit der Modellverbindung **31** waren dazu gedacht, eine Synthesevorschrift zur Darstellung der tosylierten Markierungsvorstufe des Inhibitors zu evaluieren. Da mit den vorgestellten Methoden keine Markierungsvorstufe für die  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung erhalten wurde, war eine andere Synthesestrategie notwendig. Die Darstellung des  $^{18}\text{F}$ -markierten Inhibitors sollte nun über eine Zweischriffsynthese mittels Darstellung und Kupplung einer prosthetischen Gruppe erfolgen. Aus der Literatur sind dazu mehrere Markierungsvorstufen und prosthetische Gruppen bekannt [104-106, 113-124]. Anhand der in der Literatur vorgestellten Ausbeuten bei der Markierung sekundärer Amine fiel die Wahl auf 1- $^{18}\text{F}$ Fluorethyl-2-tosylat ( $^{18}\text{F}$ FETos) bzw. 1-Brom-2- $^{18}\text{F}$ fluorethan ( $^{18}\text{F}$ BFE) als prosthetische Gruppe.

### **[<sup>18</sup>F]FETos als Markierungsbaustein zur Darstellung von [<sup>18</sup>F]CKIE**

Die Markierungsvorstufe für die Darstellung von 1-[<sup>18</sup>F]Fluorethyl-2-tosylat ([<sup>18</sup>F]FETos) (Abbildung 72), 1,2-Ditoluensulfonylethan, ist kommerziell erhältlich. Die Radiomarkierung der Verbindung wird als sehr einfach beschrieben und die Verbindung weist ein breites Anwendungsfeld auf [76].



**Abbildung 72: Darstellung von [<sup>18</sup>F]FETos**

Die Darstellung erfolgte zunächst in manuell durchgeführten orientierenden Optimierungsversuchen. Dazu wurden ca. 4 mg Markierungsvorstufe in 1 ml Acetonitril zu dem getrockneten [<sup>18</sup>F]Fluorid (vgl. 3.3.1) gegeben und das Reaktionsgefäß fest verschlossen. Tabelle 16 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 16: Versuche zur Darstellung von [<sup>18</sup>F]FETos ausgehend von getrocknetem [<sup>18</sup>F]Fluorid in 1 ml Acetonitril** (MV: Markierungsvorstufe, RG: Reaktionsgemisch, NP: Nebenprodukte)

Lf. Nr.	Masse MV [mg]	Startaktivität [MBq]	Anteil [ <sup>18</sup> F]FETos im RG [%]	NP [%] (ohne Fluorid)	Temp. [°C]	Zeit [min]
1	4,0	200	69	5	80	5
2	4,0	471	87	0	80	5
3	4,0	471	56	21	80	30
4	3,8	128	72	11	120	5
5	5,4	138	78	11	90	3

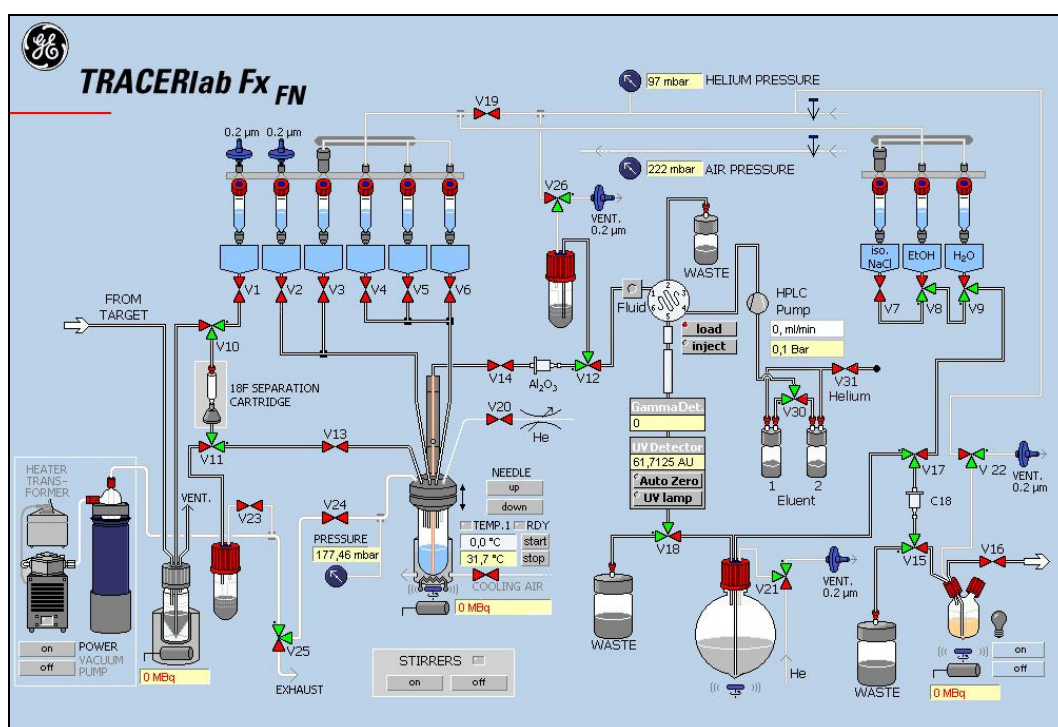
Nach einer Reaktionszeit von 3 min bei 80°C kann bereits ein Anteil von ca. 70% [<sup>18</sup>F]FETos detektiert werden (lf. Nr. 1/2). Eine Verlängerung der Reaktionszeit bewirkt keine Verbesserung der Ausbeute, es kommt zur Zersetzung des [<sup>18</sup>F]FETos in ein hydrophileres Nebenprodukt, wodurch die Ausbeute sinkt (lf. Nr. 3). Auch eine Erhöhung der Temperatur auf 90°C bzw. 120°C bringt keine wesentliche Steigerung der Ausbeute.

In der Literatur werden ähnliche Reaktionsbedingungen beschrieben. Lu *et al.* [76] berichten von der Umsetzung von 2 mg der Markierungsvorstufe in Acetonitril bei 110°C innerhalb von 10 min und Piel *et al.* [164] erzielen beim Einsatz von 4 mg Markierungsvorstufe in Acetonitril innerhalb von 3 min ähnliche Ausbeuten, wie die hier dargestellten. Comagic *et al.* [173] erhalten bei Einsatz der doppelten Menge Markierungsvorstufe (8-10 mg) unter gleichen Bedingungen (inklusive der Reinigung

der prosthetischen Gruppe mittels semipräparativer HPLC) eine radiochemische Ausbeute von 50%.

### Übertragung auf ein Synthesemodul

Ausgehend von diesen sehr vielversprechenden Markierungsausbeuten wurde die Synthese auf ein Synthesemodul der Firma GE übertragen. Abbildung 73 zeigt das Fließschema des Moduls. Die Darstellung des Markierungsbausteins in einem Synthesemodul ist sehr vorteilhaft, da hohen Radioaktivitätsmengen sicher gehandhabt werden können. Die Bedienung des Synthesemoduls erfolgt computergesteuert, was zu reproduzierbaren Ergebnisse der Radiosynthesen führt. Das Synthesemodul verfügt über Komponenten, die es ermöglichen, die Reaktionslösung zu erhitzen, zu kühlen, sowie Substanzen zu unterschiedlichen Zeiten zum Reaktionsgemisch zuzugeben. Das jeweilige Reagenz wird dazu mittels Stickstoffdruck aus den Vorratsgefäßen V1-V6 über Teflonkapillaren in das Reaktionsgefäß überführt. Dadurch muss nicht manuell in den Syntheseablauf eingegriffen werden. Für die semipräparative Reinigung ist eine HPLC-Anlage an das System angeschlossen.



**Abbildung 73: Allgemeine schematische Darstellung des Fließschemas des Programms TRACERlab Fx<sub>FN</sub>**

Es wurden die gleichen Bedingungen wie in den manuellen Synthesen angewendet. Die Umsetzung von 1,2-Ditoulolsulfonylethan zum [<sup>18</sup>F]FETos erfolgte bei 80 °C innerhalb von 5 min unter Einsatz von 4 mg Markierungsvorstufe in 1 ml Acetonitril.

Ausgehend von beispielsweise 2,6 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid erhält man so in einer Gesamtsynthesezeit von 35 min 2,0 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]FETos mit einer radiochemischen Reinheit von 75%. Die vorhandenen Verunreinigungen entsprechen zum größten Teil nicht umgesetztem [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid.

### Aspekte der Reaktionsführung

Für den Einsatz als prosthetische Gruppe muss allerdings neben der radiochemischen auch die chemische Reinheit in Betracht gezogen werden. Vor allem die nicht umgesetzte Markierungsvorstufe tritt bei der folgenden Umsetzung in Konkurrenz zum Markierungsbaustein Gruppe, da sie über dieselbe Abgangsgruppe zur Reaktion mit dem sekundären Amin der Inhibitorvorstufe verfügt. Es muss also ein Reinigungsschritt vor der Umsetzung mit der Inhibitorvorstufe eingefügt werden. Eine Zwei-Schritt/Ein-Topf-Durchführung ist daher nicht ideal. Zwei weitere Gründe sprechen gegen eine Ein-Topf-Durchführung: Zum einen müssten dazu beide Reaktionen im gleichen Lösungsmittel durchgeführt werden. Daher sollte das verwendete Lösungsmittel für beide Reaktionstypen geeignet sein [174]. Die Durchführung einer Fluoralkylierung mit [ $^{18}\text{F}$ ]FETos in Acetonitril wird aber in der Literatur nicht empfohlen. In der Literatur wurde gezeigt, dass hohe Ausbeuten bei der Fluoralkylierung vor allem bei Verwendung von DMF und DMSO als Lösungsmittel erhalten werden [173]. Des Weiteren wirkt sich die Basenlabilität des [ $^{18}\text{F}$ ]FETos negativ auf die Fluoralkylierung aus, da das im Reaktionsgemisch noch vorhandene Kryptofix-Kaliumkarbonatgemisch ohne Reinigungsschritt nicht abgetrennt wird.

In Versuchen zur Darstellung des radiomarkierten Inhibitors [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE mit [ $^{18}\text{F}$ ]FETos (ohne vorherige Reinigung mittels HPLC) konnte kein Produkt detektiert werden. Bei der Umsetzung von [ $^{18}\text{F}$ ]FETos und **24** zur Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE in DMSO und Acetonitril zeigte sich bei Temperaturen unter 100°C kein Umsatz des [ $^{18}\text{F}$ ]FETos. Über 120°C wandelt sich das [ $^{18}\text{F}$ ]FETos in DMSO quantitativ in ein nicht näher charakterisiertes, wesentlich hydrophileres Nebenprodukt mit einer Retentionszeit von 4,4 min um, bei dem es sich um [ $^{18}\text{F}$ ]Fluoracetaldehyd handeln könnte. Es konnte keinerlei Produkt detektiert werden.

Prenant *et al.*, 2007 [175] beschreiben die Synthese von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluoracetaldehyd ausgehend vom [ $^{18}\text{F}$ ]FETos in DMSO unter Einwirkung von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  bei einer Reaktionstemperatur von 150°C innerhalb von 3 min nach den Bedingungen einer Kornblum-Oxidation. Dazu wird das [ $^{18}\text{F}$ ]FETos nach der Synthese nicht gereinigt sondern direkt mit DMSO versetzt. Die im Reaktionsgemisch durch die Fluoridtrocknung vorhandene Menge an  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ist für die Hydrolyse des [ $^{18}\text{F}$ ]FETos

ausreichend und das zugesetzte DMSO wirkt oxidierend [175]. Die gleichen Reaktionsbedingungen lagen bei dem Versuch,  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  aus  $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$  darzustellen, vor, abgesehen von der zusätzlich vorhandenen Markierungsvorstufe **24**. Wahrscheinlich ist die Oxidation des  $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$  bevorzugt oder läuft schneller ab, als die *N*-Alkylierung von **24**.  $[^{18}\text{F}]\text{Fluoracetaldehyd}$  kann zwar auch zur Fluorethylierung eingesetzt werden, allerdings nur unter reduktiven Bedingungen [175].

### Schlussfolgerung

$[^{18}\text{F}]\text{FETos}$  ist aufgrund seiner einfachen Darstellung sehr verbreitet und wird erfolgreich für die *O*-Alkylierung eingesetzt. Trotzdem weist es Nachteile bei der Anwendung auf. Die Verbindung ist sensitiv gegenüber einigen Basen und Lösungsmitteln und in Bezug auf eine *N*-Alkylierung weniger reaktiv als z.B.  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltriflat}$  oder ein  $[^{18}\text{F}]\text{Bromfluorethan/Alkaliiodsalz-Gemisch}$ . Des Weiteren muss die prosthetische Gruppe über semipräparative HPLC gereinigt werden, eine Abtrennung von der Markierungsvorstufe über Festphasenextraktion ist nicht möglich, da sich Produkt und Edukt sehr ähnlich sind. Eine vollständige Abtrennung der Markierungsvorstufe ohne Verluste an Produkt lässt sich somit wahrscheinlich nicht realisieren [115].

Dementsprechend wurde die radioaktive Markierung von **24** mit  $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$  zur Darstellung von  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  nicht weiter untersucht.

### $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$ als Markierungsbaustein für die Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$

Aufgrund der fehlgeschlagenen Experimente zur Darstellung von  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  mit  $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ , wurde die Markierung über 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]\text{fluorethan}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$ ) getestet.

### 1,2-Dibromethan als Markierungsvorstufe

Zu Beginn wurde 1,2-Dibromethan als Markierungsvorstufe verwendet (Abbildung 74).

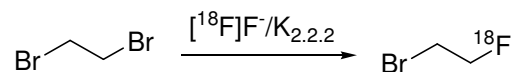


Abbildung 74: Darstellung von  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  aus 1,2-Dibromethan

In den ersten Versuchen wurde eine maximale Ausbeute von 20% erzielt, was eventuell auf den käuflich erworbenen Precursor zurückzuführen ist, der vor der Synthese nicht gereinigt wurde. Auch eventuell vorhandene Wasserspuren könnten zu den geringen Ausbeuten führen, da Wasser im Reaktionsgemisch durch die Bildung von Hydrathüllen die Nukleophilie des  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorids}$  senkt. Tabelle 17 fasst die

Ergebnisse der Radiosynthesen bei einer Reaktionszeit von 10 min ausgehend von getrocknetem [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid in 1 ml Acetonitril zusammen.

**Tabelle 17: Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE in 1 ml MeCN, ausgehend von getrocknetem Fluorid**  
(MV: Markierungsvorstufe, RG: Reaktionsgemisch, NP: Nebenprodukte)

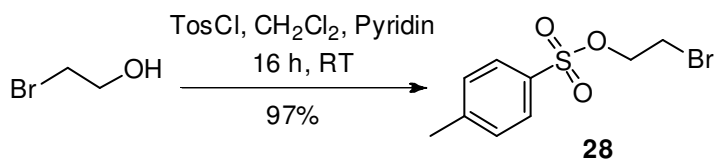
#	Masse MV [ $\mu\text{l}$ ]	Startaktivität [MBq]	Anteil [ $^{18}\text{F}$ ]BFE im RG [%]	NPs [%] (ohne Fluorid)	Temp. [ $^{\circ}\text{C}$ ]
1	2,3	100	0	0	70 $^{\circ}\text{C}$
2	5	132	9	0	70 $^{\circ}\text{C}$
3	5	130	16	11	120 $^{\circ}\text{C}$
4	5	581	5	13	100 $^{\circ}\text{C}$

In diesen Versuchen zeigte sich, dass die Anwendung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE hohe Anforderungen an die Ausrüstung (z.B. Analytik) und verwendeten Materialien stellt. Die Reinigung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE gestaltet sich ebenfalls schwierig: Eine Reinigung über Festphasenextraktion ist aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Markierungsvorstufe und Produkt nicht anwendbar, eine semipräparative HPLC würde den zeitlichen und materiellen Aufwand stark erhöhen. [ $^{18}\text{F}$ ]BFE ist stark flüchtig, die Reinigung über Destillation wäre möglich und wird auch in der Literatur häufig angewendet [115, 176, 177]. Allerdings ist die technische Realisierung im verfügbaren Synthesemodul nur aufwendig möglich.

### **Bromethyltosylat bzw. Bromethylnosylat als Markierungsvorstufen**

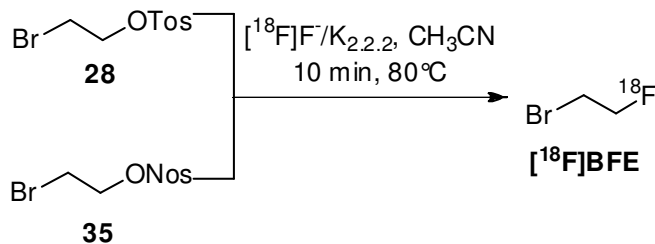
Die Markierung ausgehend vom 1-Bromethyltosylat (1-Brom-2-toluolsulfonylethan, **28**) und auch Bromethylnosylat (2-Bromethyl-p-nitrobenzolsulfonat, **35**) sollte zum gewünschten Ergebnis führen, da in der Literatur eine vereinfachte Reinigung über Festphasenextraktion beschrieben wird. Guhlke *et al.* [178] beschreiben die Reinigung des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE ausgehend von der Nosylmarkierungsvorstufe mittels zweier unterschiedlich polarer Festphasenkartuschen, einer Waters Sep Pak C18 und einer Macherey-Nagel HRP Kartusche: Das Reaktionsgemisch wird, mit Wasser verdünnt, erst über eine Waters Sep Pak C18 und anschließend direkt über eine HRP-Kartusche gegeben. Die Markierungsvorstufe ist aufgrund des Nosylrestes lipophiler/unpolarer als die prosthetische Gruppe und wird somit auf der Waters Sep Pak C18 Kartusche zurückgehalten, das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE passiert die Waters Sep Pak C18 Kartusche und wird dann auf der Macherey-Nagel HRP-Kartusche adsorbiert. Somit kann eine fast vollständige Trennung erzielt werden. Die Elution des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE von der HRP-Kartusche kann nach einer Trennung der beiden Kartuschen mit Acetonitril oder DMF separat erfolgen.

Diese Vorgehensweise sollte sich auf die Reinigung des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE, ausgehend von der Tosylmarkierungsvorstufe, übertragen lassen.



**Abbildung 75: Darstellung der Tosylmarkierungsvorstufe 1-Brom-2-toluensulfonylethan**

**28** kann durch Umsetzung von Bromethanol mit Tosylchlorid erhalten werden (Abbildung 75), **35** kann kommerziell erworben werden. Die Darstellung der Nosylmarkierungsvorstufe **35** nach den Bedingungen des Tosylats **28** schlug fehl. Beide Markierungsvorstufen lassen sich in den Markierungsbaustein [ $^{18}\text{F}$ ]BFE umsetzen (Abbildung 76).



**Abbildung 76: Darstellung des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE aus den beiden Markierungsvorstufen**

Die Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE ausgehend von der Tosylmarkierungsvorstufe **28** wurde zu Beginn optimiert. Die optimalen Bedingungen wurden dann auf die Markierung des Nosylats **35** übertragen, da bis zu diesem Zeitpunkt die [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorierung von **35** noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Die gewählten Bedingungen orientierten sich an Literaturvorschriften zur Umsetzung von 1,2-Dibromethan mit [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid [177, 179]. Die in Tabelle 18 zusammengefassten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Markierung jeweils nach ca. 5 min abgeschlossen ist, eine Verlängerung der Reaktionszeit führt zu keiner wesentlichen Steigerung der Ausbeute. Des Weiteren zeigt sich, dass mindestens 5 mg Markierungsvorstufe für die Reaktion eingesetzt werden müssen. In späteren Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz einer größeren Menge an Markierungsvorstufe keinen Anstieg der Ausbeute bewirkt. Bei einer Reaktionstemperatur von 80°C entsteht neben dem [ $^{18}\text{F}$ ]BFE auch [ $^{18}\text{F}$ ]FETos als Nebenprodukt, bei einer Reaktionstemperatur von 120°C entstehen ein bis zwei weitere hydrophilere Nebenprodukte (max. 10%), welche in der analytischen HPLC fast zeitgleich mit dem [ $^{18}\text{F}$ ]BFE eluieren. Diese beiden Nebenprodukte wurden nicht identifiziert.

**Tabelle 18: Optimierung der Umsetzung von 28 mit [<sup>18</sup>F]Fluorid in 1 ml Acetonitril**  
(MV: Markierungsvorstufe)

Temp. [°C]	Masse MV [mg]	Zeit [min]	Anteil [ <sup>18</sup> F]BFE [%]	Anteil [ <sup>18</sup> F]FETos [%]
80	1	5	21	7
80	1	10	20	7
80	1	15	20	6
80	3	5	23	5
80	3	10	23	5
80	3	15	24	5
80	5	5	62	4
80	5	10	70	4
80	5	15	64	4
120	5	10	60	7
120	5	15	61	6

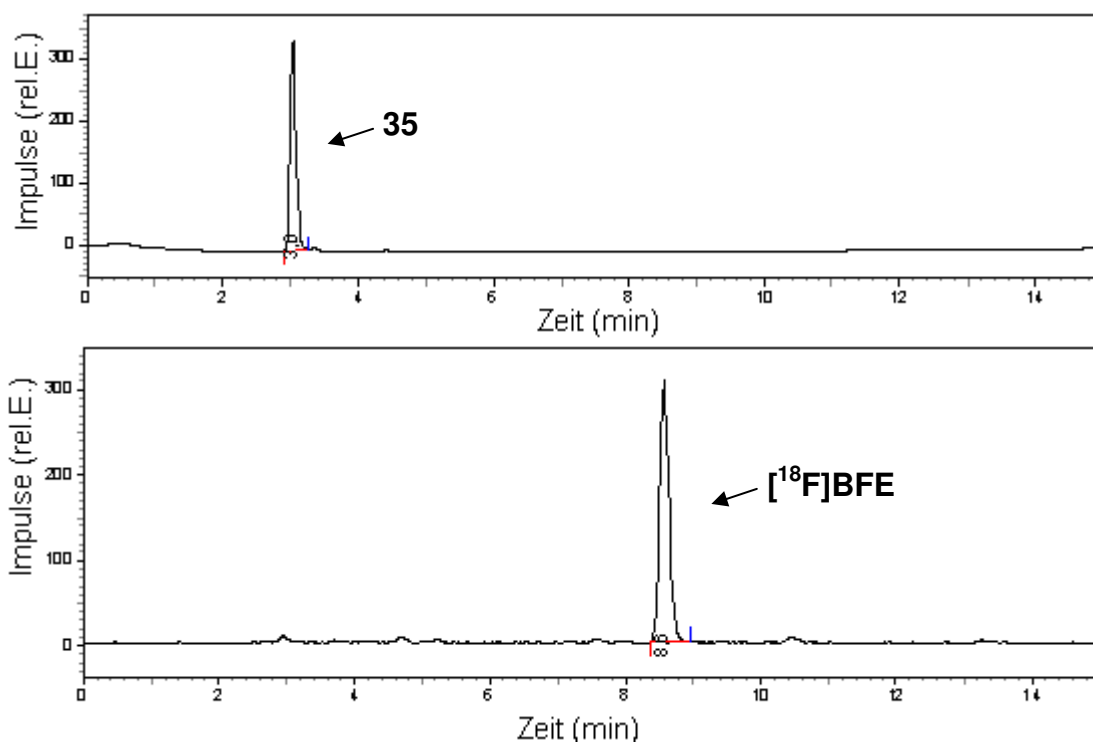
Für die Übertragung auf das Synthesemodul wurden folgende Bedingungen übernommen: 5 mg **28**, 1 ml Acetonitril, 10 min, 80 °C.

Bei der Darstellung von [<sup>18</sup>F]BFE aus dem Nosylat **35** konnte unter diesen Bedingungen ein Anteil von 80% Produkt im Reaktionsgemisch erzielt werden, die restlichen 20% stellten unumgesetztes [<sup>18</sup>F]Fluorid dar. Auch bei der Darstellung aus dem Nosylat konnte ab einer Reaktionstemperatur von 100 °C die Entstehung eines der neuen hydrophileren Nebenprodukte festgestellt werden. Um die Bildung der Nebenprodukte möglichst zu verhindern, wurde mit einer Reaktionstemperatur von 80 °C gearbeitet.

### **Übertragung auf ein Synthesemodul**

Die Synthesebedingungen lassen sich anschließend problemlos auf das Synthesemodul übertragen. Ausgehend von 5 mg **35** wird der Markierungsbaustein [<sup>18</sup>F]BFE in guten radiochemischen Ausbeuten (RCA: 36-48%, zerfallskorrigiert) mit hoher radiochemischer Reinheit von > 95% erhalten. In vereinzelt Experimenten wurde in analytischen HPLC-Untersuchungen einer Probe des Festphasen-gereinigtem [<sup>18</sup>F]BFE eine unvollständige Abtrennung der Nosylmarkierungsvorstufe **35** festgestellt (Abbildung 77).





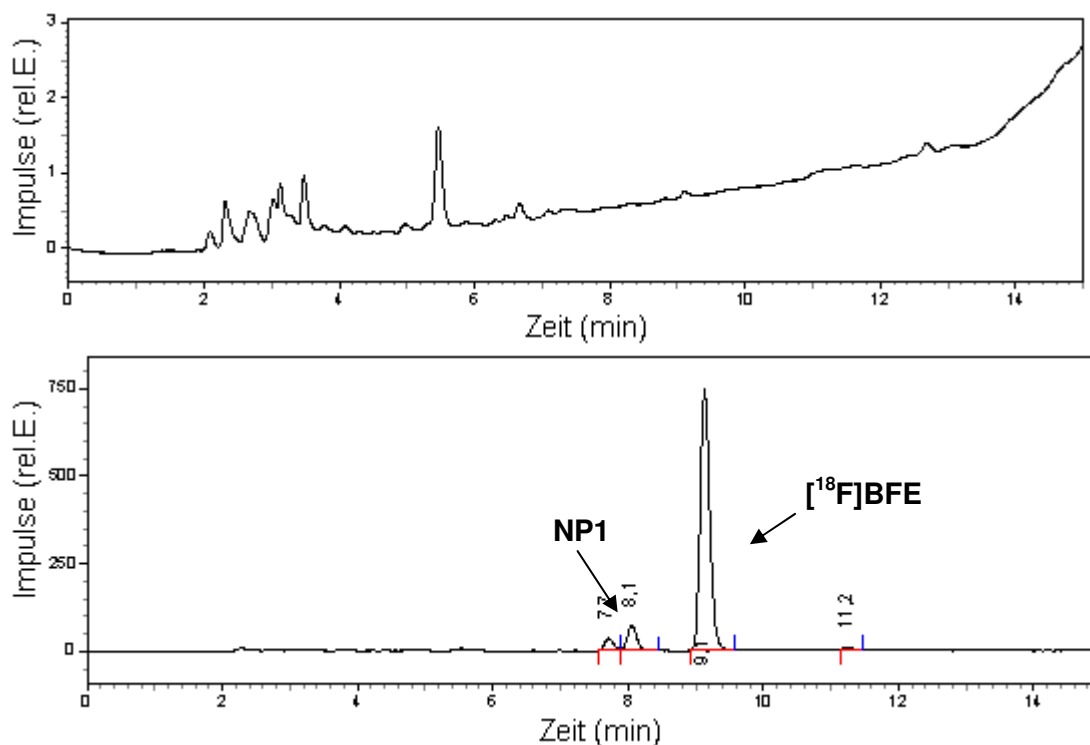
**Abbildung 77: HPLC Chromatogramme des Festphasen-gereinigten  $[^{18}\text{F}]$ BFEs aus dem Nosylat**  
oben: UV-Chromatogramm; unten Radiochromatogramm

Ob die Abtrennung mit einer größeren Waters Sep Pak C18-Kartusche zuverlässig zu einer höheren chemischen Reinheit führt, wurde nicht untersucht.

Die UV-Chromatogramme des  $[^{18}\text{F}]$ BFE aus der Tosylmarkierungsvorstufe **28** zeigen stets die Abwesenheit der Markierungsvorstufe. Auch bei Einsatz einer größeren Mengen **28** (15 mg) bleibt die chemische Reinheit ausreichend hoch und es kann kein Peak der Markierungsvorstufe detektiert werden.

Bei Verwendung des Tosylats **28** entsteht in den Modulsynthesen  $[^{18}\text{F}]$ FETos als Nebenprodukt (10-22%), das aber an der C-18 Kartusche adsorbiert und damit aus dem Produktgemisch entfernt werden kann. Die radiochemische Reinheit des im Modul synthetisierten  $[^{18}\text{F}]$ BFE aus dem Tosylat **28** ist niedriger (> 86%) als die des aus dem Nosylat **35** dargestellten  $[^{18}\text{F}]$ BFE, aber für nachfolgende Synthesen ausreichend. Die entstandenen hydrophileren Nebenprodukte lassen sich nicht über das Kartuschensystem entfernen, da sie ebenfalls auf der HRP-Kartusche adsorbiert werden. Abbildung 78 zeigt das UV- und Radiochromatogramm einer analytischen HPLC-Untersuchung des Eluats der HRP-Kartusche. Neben dem Peak für das  $[^{18}\text{F}]$ BFE werden die beiden Peaks der entstandenen hydrophileren Nebenprodukte mit einer Retentionszeit von 7,7 bzw. 8,1 min detektiert. Der Peak mit der Retentionszeit von 8,1 min entspricht dem Nebenprodukt **NP1**.

In einer Beispielsynthese konnten ausgehend von **28** und 11,9 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid innerhalb von 38 min (inklusive der Festphasenextraktion) 5,0 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]BFE (RCA: 50%, zerfallskorrigiert) hergestellt werden. Die durchschnittliche Ausbeute lag bei 41% (n = 14).



**Abbildung 78: HPLC Chromatogramme des festphasengereinigten [ $^{18}\text{F}$ ]BFEs aus dem Tosylat 35**  
oben: UV-Chromatogramm; unten Radiochromatogramm

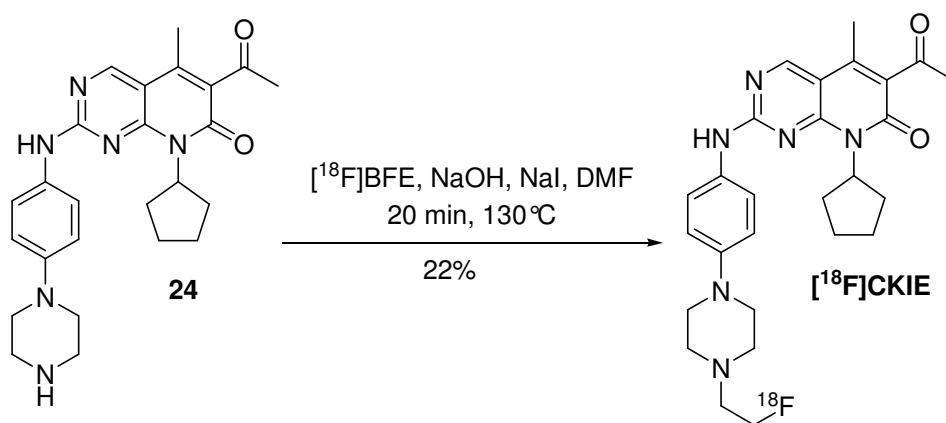
Die Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE aus dem Tosylat **35** erwies sich als eine geeignete Methode um den Markierungsbaustein in guten, reproduzierbaren Ausbeuten herzustellen. Die folgenden Experimente zur Darstellung des [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE erfolgten ausschließlich unter Einsatz des aus dem Tosylat **35** synthetisierten [ $^{18}\text{F}$ ]BFE.

### 3.3.5 Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE

Die Fluorethylierung mit [ $^{18}\text{F}$ ]BFE wurde nur für die Darstellung des [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE durchgeführt, da die fluorierten Referenzsubstanzen **CKIC** und **CKID** zu geringe inhibitorische Wirkungen in der Durchflusszytometrie zeigten und daher für die Untersuchung der radiopharmakologischen Eigenschaften ausgeschlossen wurden.

Zur Radiomarkierung eines Amins mit [ $^{18}\text{F}$ ]BFE werden in der Literatur zwei Möglichkeiten vorgeschlagen, um höhere Ausbeuten zu erzielen. Zum einen sollte der

Zusatz einer Base erfolgen, um das entstehende HBr abzufangen. Zum anderen wird der Zusatz eines Iodids empfohlen, um das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE *in situ* analog einer Finkelsteinreaktion in das korrespondierende 1- $^{18}\text{F}$ Fluor-2-iodethan ([ $^{18}\text{F}$ ]IFE) und damit in eine reaktivere Form umzuwandeln [177, 180]. Zhang *et al.* konnten durch Zusatz von 1 mg NaI die Ausbeute der Fluorethylierung eines Piperidins mit [ $^{18}\text{F}$ ]BFE von  $32 \pm 2,5\%$  (10 min,  $130^\circ\text{C}$ ) auf  $86 \pm 5,0\%$  unter sonst gleichen Bedingungen steigern [177]. Baumann *et al.* wiesen nach, dass die Ausbeuten bei der Fluorethylierung bei Einsatz von LiI am höchsten sind, gefolgt von NaI. Bei der Verwendung von KI und CsI sind die geringsten Effekte zu beobachten. Des Weiteren zeigten sie, dass die Verwendung von DMSO und DMF bessere Ausbeuten bringt als die Verwendung von Acetonitril [180], vermutlich, da die Löslichkeit der verwendeten Alkaliiodide in diesen beiden Lösungsmitteln höher ist.



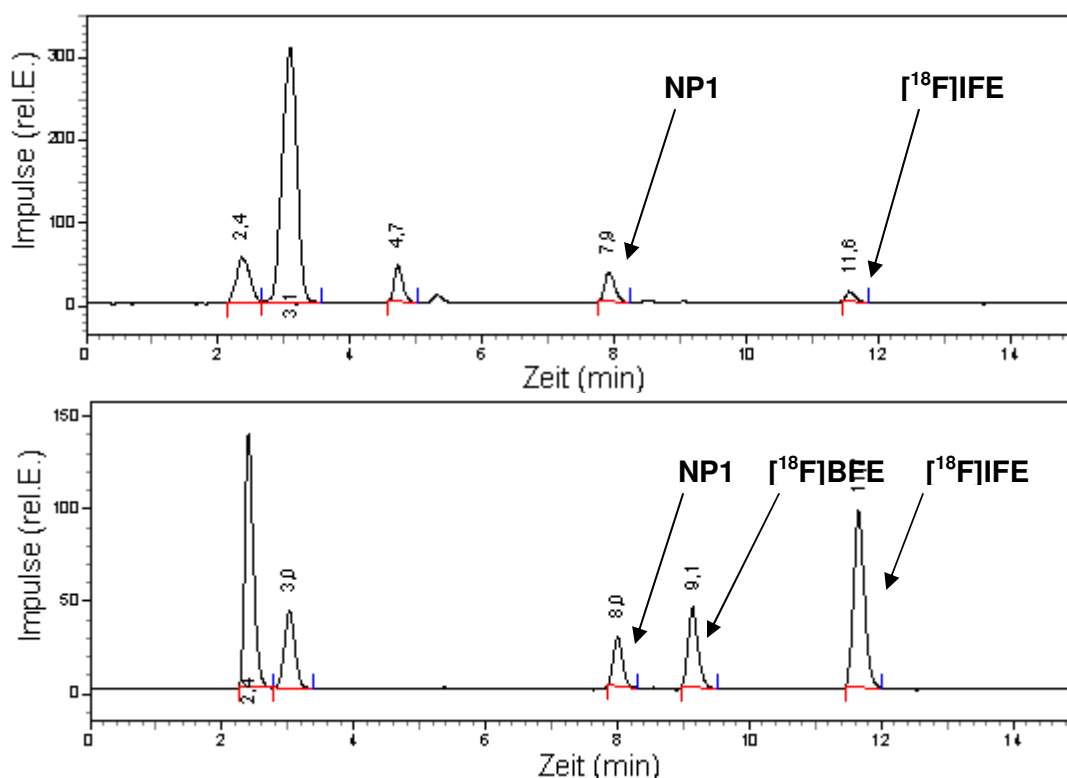
**Abbildung 79: Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE**

### Optimierungsversuche

Die ersten Optimierungsversuche gingen von einer Umsetzung von ca. 100-400 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]BFE mit 2 mg **24** in 500  $\mu\text{l}$  Lösungsmittel innerhalb von 20 min aus. Zum Teil wurden jeweils 3 mg Natriumiodid zugesetzt, um zu überprüfen, ob sich die Ausbeute dieser Reaktion durch eine Finkelstein-ähnliche Aktivierung steigern lässt. Die Optimierung erfolgte nach den Parametern Lösungsmittel, Natriumiodid, Reaktionstemperatur und einzusetzende Base (Tabelle im Anhang B Seite 179). Das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE wurde mit wenig DMF (0,5-1 ml) von der HRP-Kartusche eluiert. Für die Umsetzung wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  des Eluats zu den einzelnen Ansätzen gegeben. Es wurde maximal mit einer Reaktionstemperatur von  $130^\circ\text{C}$  gearbeitet, um die Dichtigkeit des Systems zu gewährleisten. In den ersten Versuchen mit Natriumhydroxid (10  $\mu\text{l}$ , 0,1 M in dest. Wasser), Tributylammoniumhydroxid (TBAH, 10  $\mu\text{l}$ , 1 M in MeOH), Natriumhydrid (10  $\mu\text{l}$ , 1,5 mg in 20 ml DMSO) sowie  $\text{KO}^t\text{Bu}$  (10  $\mu\text{l}$ , 1,5 mg in 20 ml

DMSO) zeigte sich die Bildung zweier sehr hydrophiler Nebenprodukte, die mit dem Totvolumen des analytischen HPLC-Systems eluierten. Diese Nebenprodukte wurden nicht weiter charakterisiert. In der Literatur wird [ $^{18}\text{F}$ ]BFE als hydrolyseempfindlich beschrieben [176], so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um Zersetzungsprodukte handelt.

In den Optimierungsversuchen konnte festgestellt werden, dass die Entstehung dieser Nebenprodukte aus der Einwirkung der Basen auf das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE resultieren. Bei der Umsetzung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE mit der Markierungsvorstufe **24** in Abwesenheit einer Base (mit oder ohne Natriumiodid) wurde die Bildung dieser Nebenprodukte nicht bzw. in sehr geringen Ausmaß festgestellt. Um die Zersetzungserscheinungen genauer zu untersuchen, fanden Experimente ohne die Verwendung der Markierungsvorstufe **24** statt (Abbildung 80).



**Abbildung 80: Analytisches Radio-HPLC-Chromatogramm des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE nach 10 min**  
oben: MeCN, 130 °C, NaI, NaH; unten: MeCN/DMF (1:1), 130 °C, NaI, NaOH

Bei der Reaktion von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE bei 130 °C in Acetonitril mit den entsprechenden Basen kann man unabhängig von der Zugabe des Alkaliiodids die fast vollständige Zersetzung des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE innerhalb von 10 min beobachten (Abbildung 80 oben).

Bei der Reaktion mit NaOH und NaI in einem 1:1 Gemisch aus Acetonitril und DMF zerfällt das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE in die in Abbildung 80 (unten) gezeigten Verbindungen. Der Anteil an **NP1** bleibt konstant bei ca. 7%, ein Teil des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE wird unter Einfluss des

Alkaliiodids in  $[^{18}\text{F}]\text{IFE}$  umgewandelt (31%). Der Anteil der neuen hydrophilen Nebenprodukte beträgt insgesamt 48%. 13% des  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  liegen unumgesetzt vor.

Es zeigt sich für die Radiomarkierung der Markierungsvorstufe **24** unabhängig von der Wahl des Lösungsmittels folgendes Bild:

- Bei einer Durchführung ohne Base und Iodid entsteht kein  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  und das  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  wandelt sich quantitativ in das schon aus der Herstellung des  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  bekannte **NP1** um, die Bildung der neuen Nebenprodukte liegt unter 10%.
- Bei der Darstellung mit Base und Iodid kommt es zur Bildung geringer Mengen  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ , dass  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  wird zu einem Großteil in  $[^{18}\text{F}]\text{IFE}$  umgewandelt und es entsteht eine geringe Menge neues **NP1**. Ein großer Teil des  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  wird in die neuen Nebenprodukte umgewandelt.
- Ohne die Verwendung des Iodids steigt der Anteil der neuen Nebenprodukte noch weiter an.

Eine mögliche Zersetzung der Markierungsvorstufe **24** kann ausgeschlossen werden, da im UV-Chromatogramm fast nur der Peak der Markierungsvorstufe detektiert wurde, UV-aktive Zersetzungsprodukte traten nicht auf.

Tabelle 19 zeigt die Optimierungsversuche mit den maximalen Ausbeuten an.

**Tabelle 19: Optimierungsversuche mit maximaler Ausbeute**

Der Anteil an Edukt spiegelt freies  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  und  $[^{18}\text{F}]\text{IFE}$  wider, der Anteil aller 3 Nebenprodukte (NP) wurde ebenfalls zusammengefasst.

LM	Temp. [°C]	Iodid	Base	Anteil Produkt [%]	Anteil Edukt [%]	Anteil NP [%]
DMF	130 °C		NaOH	33	46	13
DMF	130 °C	NaI	NaOH	38	40	10
Sulfolan	130 °C	NaI	KO <sup>t</sup> Bu	26	42	32
Sulfolan	130 °C		KO <sup>t</sup> Bu	55	3	42
Sulfolan	130 °C		TBAH	40	0	60

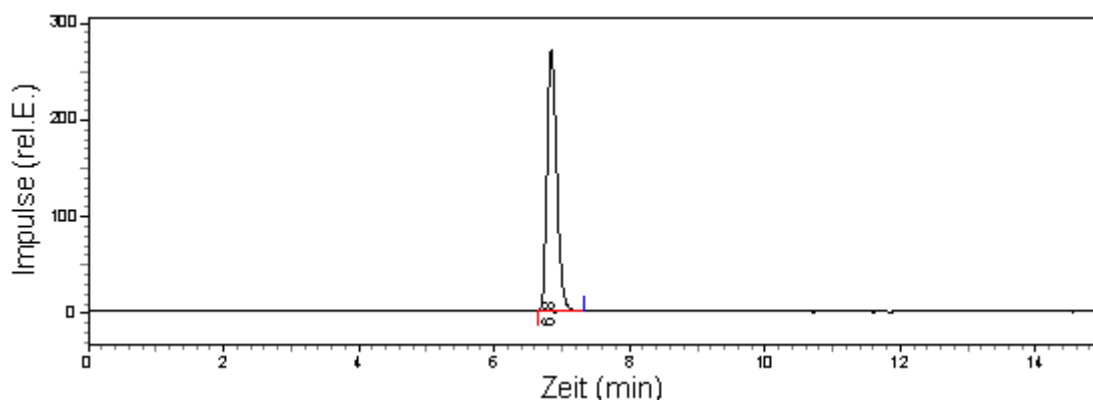
Die Umsetzung in Sulfolan brachte in den Optimierungsversuchen hohe Ausbeuten, leider ließ sich das nicht auf Umsetzungen mit höherem Aktivitätsniveau für weiterführende Experimente anwenden. Die HRP-Kartusche ließ sich nicht mit reinem Sulfolan eluieren. Es ist ein sehr hoher Druck notwendig, unter dem es zur Zerstörung der Kartusche kam. Die Kartusche konnte mit einem Gemisch aus Sulfolan/DMF (3/7)

eluiert werden. Bei der Verwendung des Gemischs als Lösungsmittel zur Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE sank die Ausbeute. Bei der Verwendung von DMF als alleiniges Lösungsmittel wurden höhere Ausbeuten erzielt. Eine Verlängerung der Reaktionszeit brachte keinen wesentlichen Anstieg der Ausbeute, das verbleibende Edukt wurde größtenteils in die Nebenprodukte umgewandelt.

Nach dieser Optimierung wurden 6,5 mg **24**, 10  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH und 9 mg NaI in max. 1 ml DMF bei einer Temperatur von 130 °C als optimale Bedingungen zur Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE für weiterführende Experimente ausgewählt.

### Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE für weiterführende Experimente

Die Übertragung auf das Synthesemodul brachte einige technische Schwierigkeiten mit sich. Das verwendete Modul lässt keine Möglichkeit zu, das Reaktionsgemisch über zwei Kartuschen zu geben und anschließend nur eine von beiden zu eluieren. Außerdem verfügt es über nur ein erhitzbares Reaktionsgefäß. Zur Lösung des Problems wurde eine Modulsynthese des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE und anschließend eine manuelle Elution der HRP-Kartusche und Synthese des [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE durchgeführt. Dazu erfolgte erst die Synthese des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE im Modul nach den optimierten Bedingungen. Nach der Synthese wurde das Reaktionsgemisch im Reaktionsgefäß mit 20 ml dest. Wasser verdünnt und anschließend über die Kartuschenkombination gegeben. Die HRP-Kartusche wird dem System entnommen und manuell in ein zweites, konisches Glasgefäß mit einem Volumen von max. 3 ml eluiert, indem bereits die Markierungsvorstufe, sowie NaI und die Base vorgelegt wurden. Die Elution erfolgte mit max. 1 ml DMF, das sehr langsam über die Kartusche gegeben wird, um eine möglichst hohe [ $^{18}\text{F}$ ]BFE-Wiederfindungsrate zu erzielen. Anschließend wird das Glasgefäß mit zwei neuen Septen im Deckel fest verschlossen, um eine hohe Dichtigkeit des Systems zu gewährleisten. Das Reaktionsgemisch wird für 20 min auf 130 °C erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit Hilfe von flüssigem Stickstoff auf ca. Raumtemperatur abgekühlt, mit 4 ml dest. Wasser verdünnt und über die semipräparative HPLC gereinigt. Die betreffende HPLC-Fraktion (22-24 min) wird aufgefangen, mit 20 ml Wasser verdünnt und über eine Sep Pak C-18 Kartusche gegeben. Das Produkt [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE kann anschließend mit 1 ml Ethanol von der Kartusche eluiert werden (Abbildung 81).



**Abbildung 81: Analytisches Radio-HPLC-Chromatogramm der Verbindung  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  nach der Reinigung**

Diese Versuchsdurchführung erwies sich als optimal und wurde im Folgenden zur Herstellung von  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  für die radiopharmakologischen Untersuchungen angewendet. Mit dieser Versuchsdurchführung konnten beispielsweise aus 2,1 GBq  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  innerhalb von 86 min (inklusive Reinigung) 273 MBq  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  (RCA: 22%, zerfallskorrigiert ausgehend von  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$ ) hergestellt werden. Die radiochemische Gesamtausbeute zur Darstellung von  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$ , ausgehend von  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ , lag bei <9%. Das Produkt wurde mittels HPLC-Co-Injektion mit der Referenzsubstanz identifiziert.

### Diskussion

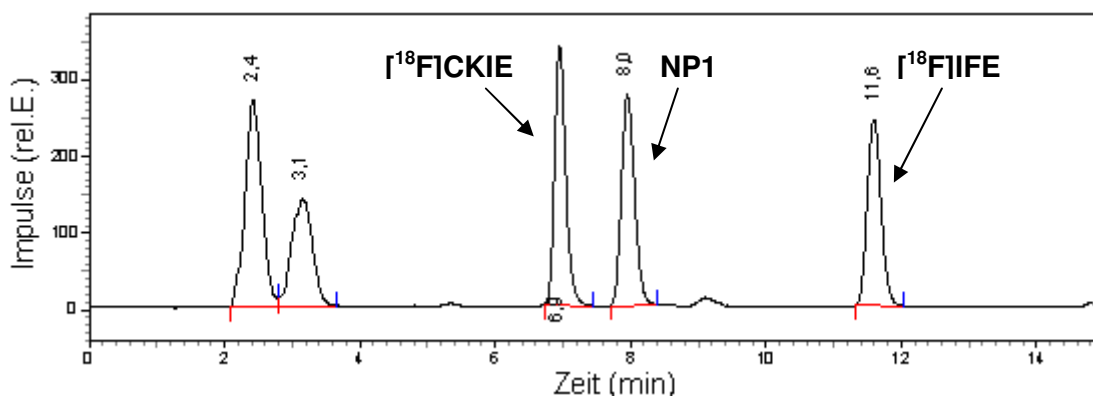
Andere in der Literatur beschriebene Fluorethylierungen am Piperazin geben ähnliche Ausbeuten ausgehend von der verwendeten prosthetischen Gruppe an. So stellten Piel *et al.* [164] eine  $[^{18}\text{F}]$ fluorethylierte Verbindung her, deren Seitenkette der hier verwendeten Anilinseitenkette entspricht. Die Fluorierung erfolgte ausgehend von  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltosylat}$ , das mittels semipräparativer HPLC gereinigt wurde. Die Ausbeute der Fluorethylierung ist mit bis zu 50% zwar höher als die hier erreichten Werte, allerdings mussten Piel *et al.* [164] zwei Reinigungsschritte mittels semipräparativer HPLC durchführen. Wagner *et al.* [181] stellten fluorethylierte Inhibitoren der Matrix-Metalloproteasen vor, deren Radiosynthese von über Festphasenextraktion gereinigtem  $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$  ausgeht. Sie erzielten eine Gesamtausbeute von  $11,5 \pm 0,9\%$  bei einer radiochemischen Reinheit >97% in einer Gesamtsynthesedauer von  $147 \pm 29$  min.

Veach *et al.* [176] berichteten von einer zweistufigen Markierung eines Piperazins mit  $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$  ausgehend von der Markierungsvorstufe 1-Brom-2-ethyltriflat. Für die N-Alkylierung mit destilliertem  $[^{18}\text{F}]\text{FBE}$  wurde eine Ausbeute von  $25,1 \pm 5,8\%$  erzielt, was zu einer Gesamtausbeute von  $9,8 \pm 5,0\%$  führte. Die von Veach *et al.*

vorgeschlagenen Bedingungen zur N-Alkylierung verwenden 14,6  $\mu\text{mol}$  Markierungsvorstufe in Verbindung mit 60,0  $\mu\text{mol}$  NaI und 15,3  $\mu\text{mol}$   $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  in 500  $\mu\text{l}$  DMF/Acetonitril (1:1). Das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE wird über Destillation gereinigt und direkt in den Reaktionsansatz destilliert.

Die von Veach *et al.* [176] vorgeschlagenen Reaktionsbedingungen konnten mit kleinen Abwandlungen auf die Darstellung des [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE übertragen werden. Für die Darstellung des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE wurde die bereits vorgestellte Tosylmarkierungsvorstufe **28** (Vgl. 3.3.4.2) anstelle des 1-Brom-2-ethyltriflats verwendet. Die Reinigung der prosthetischen Gruppe erfolgte deswegen über die Festphasenextraktion unter Verwendung der vorgestellten Kartuschenkombination (Vgl. 3.3.4.2). Da die Elution der HRP-Kartuschen ein höheres Lösungsmittelvolumen verlangt (min. 0,7 ml DMF), musste ein höheres Volumen des Lösungsmittelgemischs für die Markierung verwendet werden. Anstelle der vorgeschlagenen 500  $\mu\text{l}$  eines 1:1 Gemischs aus DMF und Acetonitril kam 1 ml des Gemischs zum Einsatz. Dazu wurde 6,5 mg der Markierungsvorstufe **24**, 5 mg  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  und 9 mg NaI vorgelegt und das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE mit dem Lösungsmittelgemisch direkt dazu eluiert.

Ausgehend von 2,6 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]BFE erhält man unter den von Veach *et al.* [176] vorgeschlagenen Bedingungen innerhalb von 73 min 176 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE (RCA: 11%, zerfallskorrigiert ausgehend von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE), inklusive semipräparativer HPLC-Reinigung. Die spezifische Aktivität beträgt 25,3 GBq/ $\mu\text{mol}$ . Abbildung 82 zeigt eine HPLC-Analyse des Reaktionsgemischs vor der Reinigung.



**Abbildung 82:** Analytisches Radio-HPLC-Chromatogramm des Reaktionsansatzes bei der Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE nach den Bedingungen von Veach *et al.*

Das eingesetzte [ $^{18}\text{F}$ ]BFE ist vollständig aufgebraucht, aber es steht noch [ $^{18}\text{F}$ ]IFE für die Umsetzung zum [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE zur Verfügung. Eine Verlängerung der Reaktionsdauer auf 40 min führt nur zu einer leichten Verbesserung der Ausbeute. Das höhere



Lösungsmittelvolumen könnte ein Grund für die geringere Ausbeute sein, da eine Verringerung des Volumens mit einer höheren Konzentration und damit mit einer höheren Reaktionswahrscheinlichkeit einhergeht. Um das höhere Reaktionsvolumen auszugleichen, müsste eine größere Menge der Markierungsvorstufe **24** Einsatz finden. Das wirkt sich allerdings negativ auf die anschließende semipräparative HPLC aus. Die Abtrennung der Markierungsvorstufe **24** muss quantitativ erfolgen. Da sich die Retentionszeiten aber nur wenig unterscheiden, könnte es bei der Verwendung einer größeren Menge **24** zu Überschneidungen der Peaks bei der Elution kommen.

Die nach der Methode von Veach *et al.* [176] erhaltenen Ausbeuten sind geringer als die bei Einsatz von NaOH erreichten. Es ist möglich, dass die bei einer Reinigung des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE mittels Destillation erzielte Reinheit höher ist, als die über Festphasenextraktion erzielte. Eine geringere Reinheit des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE kann sich nachteilig auf die Markierungsausbeute auswirken. Wägt man aber die Vorteile einer destillativen Reinigung des radioaktiven Bausteins [ $^{18}\text{F}$ ]BFE, die höhere Reinheit und damit verbunden, die etwas höhere Ausbeute der Markierung gegenüber den Nachteilen, wie z.B. der höhere apparative Aufwand auf, so stellt die Durchführung mittels Festphasenextraktion die empfehlenswertere Variante dar. Eine Markierung mit HPLC-gereinigtem [ $^{18}\text{F}$ ]BFE wurde nicht durchgeführt. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass sich die Ausbeuten so verbessern lassen. Allerdings stellt dieser Ansatz wieder einen erhöhten apparativen Aufwand dar, dem es mit der vorgestellten Methode gelungen ist, zu vermeiden.

### 3.3.6 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Um toxische oder pharmakologische Effekte *in vivo* bei der Anwendung eines Radiotracers auszuschließen, ist es wichtig, möglichst kleine Substanzmengen (unterer  $\mu\text{g}$ -Bereich) zu applizieren. Da während einer Radiosynthese der Eintrag an nichtradioaktiven Isotopen nicht auszuschließen ist, kann je nach verwendetem Radionuklid eine entsprechend hohe Menge an nicht radioaktiver Substanz vorliegen. Ziel ist daher die Synthese der radioaktiven Substanz mit einer hohen spezifischen Aktivität. Die spezifische Aktivität einer radioaktiven Substanz gibt das Verhältnis der Aktivität bezogen auf die gesamte Stoffmenge chemisch identischer Substanzen wieder und wird meistens in  $\text{GBq}/\mu\text{mol}$  oder  $\text{MBq}/\mu\text{g}$  angegeben. Die maximal erreichbare spezifische Aktivität hängt von der Halbwertszeit, der eingesetzten Aktivitätsmenge und dem Produktionsweg des jeweiligen Radionuklides ab.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde zunächst mit den nicht radioaktiven Referenzverbindungen **CKIA**, **CKIB** und **CKIE** eine Kalibriergerade mit Hilfe des UV-Detektors der HPLC, mit der die Bestimmung der spezifischen Aktivität durchgeführt werden sollte, erstellt. Die Fläche unter dem Peak der einzelnen Konzentrationen der Referenzsubstanzen wird in Abhängigkeit zur Stoffmenge gesetzt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde dann ein Aliquot des radiomarkierten Inhibitors mit bekannter Aktivität in das HPLC-System injiziert und das UV-Chromatogramm mit Hilfe der Kalibriergerade ausgewertet. Für [ $^{124}\text{I}$ ]**CKIA** wurde ein durchschnittlicher Wert von 17 GBq/ $\mu\text{mol}$  ( $n = 5$ ) und für [ $^{124}\text{I}$ ]**CKIB** ein durchschnittlicher Wert von 22 GBq/ $\mu\text{mol}$  ( $n = 3$ ) bestimmt. Für [ $^{18}\text{F}$ ]**CKIE** ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 22,5 GBq/ $\mu\text{mol}$  ( $n = 5$ ).

Die spezifische Aktivität der  $^{124}\text{I}$ -iodierten Verbindung hängt hauptsächlich von der spezifischen Aktivität der zur Markierung eingesetzten [ $^{124}\text{I}$ ]Iodid-Lösung ab. Der Eintrag an nicht radioaktivem Iod aus der Umwelt kann vernachlässigt werden, da Iod ein seltenes Element ist. Es weist einen Massenanteil von 6 ppb auf und steht damit an 70. Stelle der Elementhäufigkeit in der Erdhülle [182, 183]. Die spezifische Aktivität der über die  $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$  Reaktion am Zyklotron MGC-20<sup>4</sup> (Ritverc, Russland) hergestellten  $^{124}\text{I}$ -Lösung beträgt ca. 1400 GBq/ $\mu\text{mol}$ . Die erreichte spezifische Aktivität von [ $^{124}\text{I}$ ]**CKIA/B** ist somit relativ niedrig. In den Zellexperimenten zeigte sich aber, dass sie für die Anwendung als Inhibitor der Cdk4/6 durchaus ausreichend ist, da eine hohe Zellaufnahme bestimmt werden konnte (Kapitel 3.4.3).

Die spezifische Aktivität des [ $^{18}\text{F}$ ]**CKIE** ist ebenfalls relativ niedrig, allerdings wurden in der Literatur in Abhängigkeit vom Reinigungsverfahren für die prothetische Gruppe ähnliche spezifische Aktivitäten beschrieben. So konnten Wagner *et al.*, eine spezifische Aktivität von  $23 \pm 10$  GBq/ $\mu\text{mol}$  für einen am Piperazin fluorethylierten MMP-Inhibitor bestimmen. Das für die Fluorierung eingesetzte [ $^{18}\text{F}$ ]**FETos** wurde über eine Festphasenextraktion an einer Sep Pak C-18 Kartusche gereinigt.<sup>5</sup> Veach *et al.* [176] erzielen für die Darstellung des [ $^{18}\text{F}$ ]fluorethylierten Dasatinibderivats bei Einsatz von ungereinigtem [ $^{18}\text{F}$ ]**BFE** (Markierungsvorstufe 1-Brom-2-ethyltriflat) eine spezifische Aktivität von  $1,1 \pm 0,4$  GBq/ $\mu\text{mol}$ . Die Reinigung des [ $^{18}\text{F}$ ]**BFE** mittels Destillation führte jedoch zu einer durchschnittlichen spezifischen Aktivität von

---

<sup>4</sup> Persönliche Mitteilung des Ritverc-Supports, Herr A. Rogozev.

<sup>5</sup> Persönliche Mitteilung: Dr. S. Wagner, Universitätsklinikum Münster, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Arbeitsgruppe Radiochemie.

94 GBq/ $\mu\text{mol}$ . Unter Verwendung von [ $^{18}\text{F}$ ]FETos erreichen sie nur eine spezifische Aktivität von 0,1-0,2 GBq/ $\mu\text{mol}$  [176].

Die Abwesenheit der Tosylmarkierungsvorstufe im Reaktionsgemisch der [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE-Darstellung konnte stets mittels analytischen HPLC-Systems bestätigt werden. Die spezifische Aktivität der prosthetischen Gruppe wurde allerdings nicht bestimmt. Die Detektion der Referenz 1-Brom-2-fluorethan lässt sich nicht über mit Hilfe eines UV-Detektors durchführen, da die Verbindung nicht absorbiert.

Prinzipiell sollte die spezifische Aktivität einer  $^{18}\text{F}$ -markierten Verbindung im Vergleich zu einer  $^{124}\text{I}$ -markierten durch den Eintrag von  $^{19}\text{F}$  aus der Umwelt geringer sein, da Fluor mit einer Elementhäufigkeit von 280 ppm (17. häufigstes Element) wesentlich häufiger vorkommt als Iod [182, 183].

### 3.3.7 Bewertung der Radiosynthesen

Die Darstellung der radioaktiv markierten Inhibitoren [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA/B und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE (Abbildung 83) wurde über Zwei-Schritt-Synthesen mit den beiden Positronen-emittierenden Nukliden  $^{124}\text{I}$  und  $^{18}\text{F}$  realisiert.

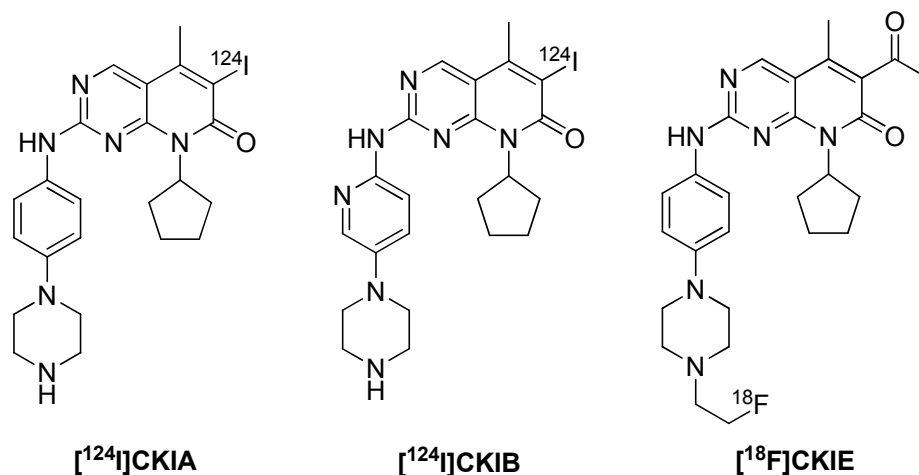


Abbildung 83: Strukturen der drei radioaktiv markierten Inhibitoren [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA/B und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE

Tabelle 20 fasst die Radiosynthesen der drei Verbindungen zusammen.

**Tabelle 20: Zusammenfassung der Radiomarkierung** (MV: Markierungsvorstufe)

	<b>[<sup>124</sup>I]CKIA</b>	<b>[<sup>124</sup>I]CKIB</b>	<b>[<sup>18</sup>F]CKIE</b>
Menge MV	0,25 mg	0,25 mg	6 mg
Synthesedauer	ca. 100 min	ca. 100 min	ca. 125 min
Aktivität Produkt	8,5-35,7 MBq	7,5-32,7 MBq	100-368 MBq
RCA	24-34 %	17-27 %	< 9%
RCR	> 98%	> 98%	> 98%
spezifische Aktivität	16,9 GBq/μmol	21,8 GBq/μmol	22,4 GBq/μmol
logD <sub>7,4</sub> (experimentell)	2,76 ± 0,11	2,00 ± 0,04	2,21 ± 0,04

Die <sup>124</sup>I-Iodierungen der beiden Verbindungen [<sup>124</sup>I]**29** und [<sup>124</sup>I]**30** liefern sehr gute Ausbeuten. Der Anteil an Produkt im Reaktionsgemisch lag nach 10 min stets über 90%. Für beide Verbindungen brachte die Verwendung von Iodotubes™ hohe Ausbeuten verbunden mit einer einfachen Aufarbeitung. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am Piperazin-Stickstoff zur Darstellung der beiden Inhibitoren [<sup>124</sup>I]**CKIA** und [<sup>124</sup>I]**CKIB** gestaltete sich schwierig. Für eine effektivere Entschützung muss die Strategie in folgenden Arbeiten weiter optimiert werden. Denkbar ist die Verwendung einer anderen Säure oder eine Variation des Reaktionsvolumens.

Der Einsatz unterschiedlicher Chargen [<sup>124</sup>I]**NaI** führte zu keinen drastischen Veränderungen der RCA. Auch unterschiedliche Produktionswege bei der Herstellung des <sup>124</sup>I hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis der Radiosynthesen. Es konnten bei Einsatz von <sup>124</sup>I, das nach der <sup>124</sup>Te(p,n)<sup>124</sup>I-Reaktion hergestellt wurde, keine Unterschiede zur Anwendung des nach der <sup>124</sup>Te(d,2n)<sup>124</sup>I-Reaktion produzierten festgestellt werden. Insgesamt waren die <sup>124</sup>I-Iodierungen beider Verbindungen gut reproduzierbar.

Die Reaktionszeit beider Synthesen könnte um ca. eine halbe Stunde reduziert werden, wenn auf die Analyse der Zwischenprodukte zur Reaktionskontrolle verzichtet wird. Die Analyse des Fortschritts der Iod-Inkorporation mittels Radio-DC dauert inklusive der Auswertung am Bas-Scanner ca. 15-20 min; für die Analyse des Fortschritts der Entschützung mittels HPLC werden 20 min benötigt. Für eine Darstellung der Verbindung unter Routinebedingungen wären diese Analysen nicht nötig bzw. könnten parallel zur Synthese durchgeführt werden und die Synthesezeit würde sich um ein Drittel der Zeit verringern.

Die Darstellung der fluorierten Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE stellte sich ebenfalls als schwierig heraus, obwohl aus der Literatur zahlreiche prosthetische Gruppen zur  $^{18}\text{F}$ -Fluorethylierung bekannt sind. Zunächst musste ein Markierungsbaustein für die *N*-Alkylierung der Markierungsvorstufe **24** zur Herstellung des Inhibitors [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE gefunden und dessen Darstellung während der Anfertigung dieser Arbeit optimiert werden. Dazu wurden vier verschiedene Markierungsvorstufen zur Darstellung von zwei verschiedenen Markierungsbausteinen evaluiert. Die Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE aus 1,2-Dibromethan wurde aufgrund der schwer zu realisierenden Reinigung verworfen, die Synthese des [ $^{18}\text{F}$ ]FETos aus 1,2-Ditoluolsulfonylethan aufgrund der geringeren Reaktivität in Bezug auf eine *N*-Alkylierung. Die Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE aus 1-Brom-2-ethyltosylat bzw. -nosylat eignet sich jedoch sehr gut für den weiteren Einsatz, da dieser Markierungsbaustein in guten Ausbeuten (> 40%) und hoher radiochemischer Reinheit (> 86%) synthetisiert werden kann. Außerdem kann bei Verwendung des Tosylats eine vollständige Abtrennung der Markierungsvorstufe über ein einfaches Kartuschensystem sichergestellt werden, um eine hohe chemische Reinheit zu gewährleisten. Andere prosthetische Gruppen wie z.B. 4-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-*N*-methyl-*N*-(prop-2-ynyl)-benzolsulfonamid (**p**[ $^{18}\text{F}$ ]F-SA, ca. 40%)<sup>6</sup> und Succinimidyl-4-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorbenzoat ([ $^{18}\text{F}$ ]SFB, 44-53% [184]) werden bei einer routinemäßigen Herstellung in ähnlichen Ausbeuten erhalten.

Die Ausbeuten der Fluorethylierung der Markierungsvorstufe **24** sind mit maximal 22 % (zerfallskorrigiert) ausgehend von der prosthetischen Gruppe, bzw. <9% ausgehend von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid recht niedrig. Bereits in den organischen Synthesen wurde die Einführung der Fluorethylkette nur mit einer maximalen Ausbeute von 19% erzielt. Wie bereits in Kapitel 3.3.5 beschrieben, wurden von anderen Arbeitsgruppen ähnliche Ausbeuten für die [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethylierung an verschiedenen Piperazin-Derivaten veröffentlicht, unabhängig von der gewählten prosthetischen Gruppe. Bei der Verwendung von [ $^{18}\text{F}$ ]FETos wirkt sich die geringe Reaktivität der Substanz gegenüber dem sekundären Amin der Markierungsvorstufe **24** negativ auf die Markierungsausbeute aus. Im Vergleich dazu konnte bei der Umsetzung von **24** mit [ $^{18}\text{F}$ ]BFE eine wesentlich höhere Ausbeute erzielt werden, da das Bromid eine sehr gute Abgangsgruppe bei der *N*-Alkylierung am sekundären Amin darstellt. Dieser Markierungsbaustein ist jedoch bei den benötigten Reaktionstemperaturen von >90°C stark flüchtig und wird leicht zersetzt [176], wodurch die Ausbeuten sinken.

---

<sup>6</sup> T. Ramenda, Dissertation, TU Dresden, unveröffentlichte Ergebnisse

Die Anwendung stark flüchtiger Markierungsbausteine wie [ $^{18}\text{F}$ ]BFE stellt einige technische Herausforderungen an die Synthese. So muss stets sichergestellt werden, dass die Apparatur abgeschlossen ist, um ein Entweichen des [ $^{18}\text{F}$ ]BFE zu verhindern. Für eine optimale Umsetzung ist eine möglichst geringe Gasphase über dem Reaktionsgemisch wichtig. Die flüchtige prosthetische Gruppe reichert sich im Gasraum an und steht so für die Reaktion nicht mehr zur Verfügung. Ein Totvolumen-armes System sollte zu wesentlich höheren Ausbeuten führen.

Für eine Routineanwendung müsste allerdings die ganze Synthese auf ein Synthesemodul übertragen werden. Bei der Anwendung der hier vorgeschlagenen kombinierten Synthese aus Modulsynthese und manueller Synthese können keine hohen Aktivitätsmengen eingesetzt werden. Es können zwar in der Darstellung der Markierungsvorstufe [ $^{18}\text{F}$ ]BFE sehr hohe Mengen an radioaktivem Produkt erzielt werden. Diese können dann aber nicht eluiert werden, da die Aktivitätsmenge für eine manuelle Synthese zu hoch ist. Um die Synthese auf ein Modul zu übertragen, benötigt man ein modifiziertes Modul. Es müsste über zwei beheizbare Reaktionsgefäße verfügen. Des Weiteren ist es zwingend notwendig, dass die Ventilschaltung eine Elution der zweiten Kartusche ohne Elution der Ersten ermöglicht.

Über die optimierten Syntheserouten konnte genügend Produkt mit ausreichender spezifischer Aktivität für weiterführende Untersuchungen dieser Substanzen dargestellt werden. So konnten Zellaufnahmeuntersuchung und Bestimmungen zur Stabilität der Verbindung *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* durchgeführt werden. Des Weiteren war es möglich, erste orientierende Untersuchungen zur Bioverteilung der radioiodierten Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB durchzuführen.

### 3.4 Radiopharmakologische Charakterisierung der $^{124}\text{I}$ - und $^{18}\text{F}$ -markierten Cdk Inhibitoren

#### 3.4.1 Bestimmung der Lipophilie

Die Lipophilie ist eine wichtige physikochemische Eigenschaft, die beim Design und der Entwicklung von Wirkungen beachtet werden muss. Sie stellt in der medizinischen Chemie einen Schlüsselparameter bei der Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dar [185-187]. Ein entscheidender Faktor für die Wirkung einer Substanz ist die Fähigkeit, an den Zielort zu gelangen. Die Lipophilie der Verbindung kann z.B. Hinweise auf mögliche Plasmaproteinbindung geben [188]. Außerdem hat sie einen

entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit einer Substanz Zellmembranen zu passieren. Für oral aufgenommene, pharmazeutisch wirksame Verbindungen wird nach der von Lipinski aufgestellten *rule of five* eine Lipophilie von -2 bis 5 als optimal angesehen, um eine hohe Aufnahme und Bioverfügbarkeit der Verbindung sicherzustellen [189]. Auf dem Gebiet des Radiotracerdesigns wird die Lipophilie einer Verbindung oft genutzt, um die Anreicherung im Zielgewebe und anderen Organen, sowie die Elimination aus dem Körper abzuschätzen [190, 191]. Die zu untersuchenden Cdk4/6-Inhibitoren sollten eine Lipophilie ( $\log D_{7,4}$ ) von unter 3 aufweisen [192], um eine ausreichende Zellaufnahme zu ermöglichen und eine ungewollte Plasmaproteinbindung zu vermeiden.

Die Lipophilie der radioaktiven Verbindungen wurde nach der Methode von Wilson *et al.* [191] ermittelt. Die Lipophilie einer Verbindung kann sich bei unterschiedlichen pH-Werten ändern, da es zu Protonierungen oder Deprotonierungen des Moleküls kommen kann, wodurch sich die Verbindung deutlich mehr in der wässrigen oder organischen Phase anreichern kann. Der  $\log P$ -Wert bezieht sich immer auf den pH-Wert bei dem die Verbindung ungeladen vorliegt. Die Bestimmungen der Lipophilie der in der vorliegenden Arbeit radiomarkierten Verbindungen erfolgten allerdings bei dem physiologisch relevanten pH-Wert von 7,4. Es wurde nicht bestimmt, bei welchem pH-Wert die Verbindungen ungeladen sind, daher erfolgt die Angabe der Lipophilie als  $\log D_{7,4}$ -Wert. Die berechneten Werte dienen zur Abschätzung der  $\log D_{7,4}$ -Werte.

**Tabelle 21: Berechnete  $\log P$  und experimentell bestimmte  $\log D_{7,4}$ -Werte der dargestellten Referenzsubstanzen**

Verbindung	$\log P$ berechnet	Lipophilie experimentell
	ChemDraw <sup>7</sup> /Molinspiration <sup>8</sup>	$\log D_{7,4}$ bei pH = 7,4
<b>CKIA</b>	3,95 / 4,87	$2,76 \pm 0,11$
<b>CKIB</b>	3,33 / 4,14	$2,00 \pm 0,04$
<b>CKIC</b>	4,51 / 5,76	n.b.
<b>CKID</b>	3,89 / 5,03	n.b.
<b>CKIE</b>	2,95 / 4,57	$2,21 \pm 0,04$

Die experimentell bestimmten  $\log D_{7,4}$ -Werte (Tabelle 21) zeigen, dass die Substitution des Phenylrings durch den Pyridinring eine signifikante Verringerung der Lipophilie mit sich bringt, die Anreicherungswahrscheinlichkeit der Verbindung [<sup>124</sup>I]CKIB in der organischen Phase verringert sich im Vergleich zur Verbindung [<sup>124</sup>I]CKIA um das Fünf- bis Sechsfache. Des Weiteren zeigt sich in den berechneten Werten, dass die

<sup>7</sup> CambridgeSoft Chemdraw Ultra 9.0.1

<sup>8</sup> Molinspiration WebME Editor: <http://www.molinspiration.com/>

Einführung der Fluorethylkette einen Anstieg der Lipophilie bewirkt. Die Hypothese, dass die Substitution des Iods gegen ein Methylketon zu geringerer Lipophilie führt, konnte bestätigt werden. Der experimentell bestimmte  $\log D_{7,4}$ -Wert für [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE ist noch geringer als der für [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA gefundene Wert. Da die Verbindungen CKIC und CKID nicht radioaktiv markiert wurden, erfolgte keine Bestimmung des  $\log D_{7,4}$ -Wertes. Die berechneten Werte geben aber Grund zu der Annahme, dass die zu erwartenden  $\log D_{7,4}$ -Werte weit über dem von CKIA liegen.

### 3.4.2 Bestimmung der *in vitro*- und *ex vivo*-Stabilität<sup>9</sup>

Um die dargestellten, radioaktiv markierten Verbindungen im Zell- und auch im Tiermodell anwenden zu können, muss eine hohe Stabilität der Verbindung sichergestellt werden.

Die Stabilität der verschiedenen radioaktiv markierten Verbindungen wurde in Ethanol, PBS (pH = 7,4), Zellkulturmedium (RPMI) und Rattenplasma nach 30 min und 24 h Inkubationszeit für [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB, bzw. nach 60 min für [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE bei 37 °C mittels HPLC untersucht (Tabelle 22). Dabei können nur Aussagen über den Anteil an noch intakter Verbindung und die Anzahl entstandener radioaktiver Metabolite getroffen werden, Aussagen über die Struktur der Metaboliten können nicht getroffen werden. Dazu müssten die nicht radioaktiven Referenzsubstanzen der vermuteten Metaboliten dargestellt werden. Die Identifikation könnte dann durch Vergleich der Retentionszeiten im gewählten HPLC-System bzw. durch Co-Injektion erfolgen.

**Tabelle 22: Bestimmung des Anteils der Verbindung ([ $^{124}\text{I}$ ]CKIA/[ $^{124}\text{I}$ ]CKIB/[ $^{18}\text{F}$ ]CKIE) nach Inkubation in den angegebenen Medien bei 37 °C (n=2)**

Verbindung	Ethanol		PBS (pH 7.4)		RPMI	Rattenplasma	
	30 min	24 h	30 min	24 h	24 h	30 min	24 h
[ $^{124}\text{I}$ ]CKIA	93%	94%	92%	86%	96%	93%	94%
[ $^{124}\text{I}$ ]CKIB	98%	97%	97%	95%	97%	94%	94%
	1 h		1 h		1 h		
[ $^{18}\text{F}$ ]CKIE	100%		86-94%		100%		

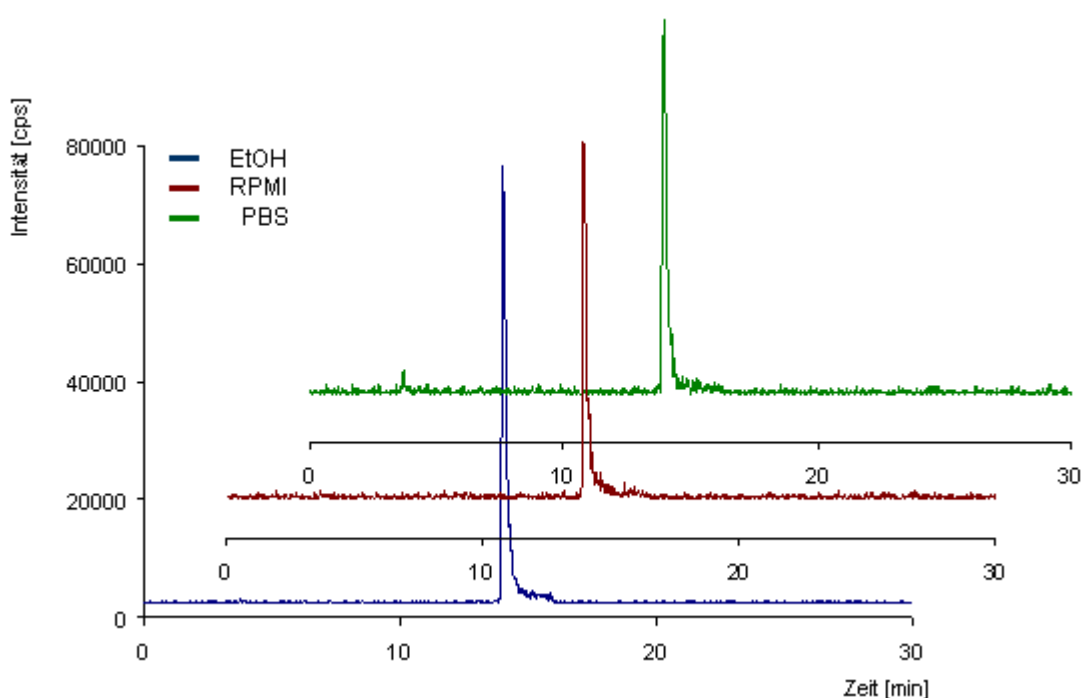
HPLC-Analysen der Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB zeigen keine wesentliche Zersetzung nach 30 min bei 37 °C in allen Medien. Sie bestätigen hohe Stabilitäten von über 92%. Die Ergebnisse der Analysen der Ansätze nach 24 h sind vergleichbar,

<sup>9</sup> Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von Frau A. Suhr durchgeführt.



abgesehen von einer etwas stärkeren Zersetzung der Verbindung [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA in PBS. In den anderen Testsystemen konnte eine sehr hohe Stabilität von >94% für alle drei Verbindungen nach 24 h festgestellt werden.

Für die Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE wurde die Stabilität nach 1 h in Ethanol, PBS und Zellkulturmedium untersucht. Abbildung 84 zeigt die Radiochromatogramme der HPLC-Analyse nach der Inkubation von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE in PBS (grüne Linie) und im Zellkulturmedium RPMI (rote Linie). Die Ergebnisse zeigen eine ähnlich hohe Stabilität wie die Untersuchung der radioiodierten Verbindungen. Eine Untersuchung der Stabilität nach 24 h ist aufgrund der geringen Halbwertszeit von 109,8 min im Vergleich zu den  $^{124}\text{I}$ -markierten Verbindungen nicht möglich.



**Abbildung 84: Analytische HPLC-Radiochromatogramme der Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE in Ethanol, RPMI und PBS nach 1 h bei 37°C**

Die bestimmten Werte zeigen eine hohe *in vitro*-Stabilität der Verbindungen, die die weitere Charakterisierung der Verbindungen an Zellmodellen rechtfertigt.

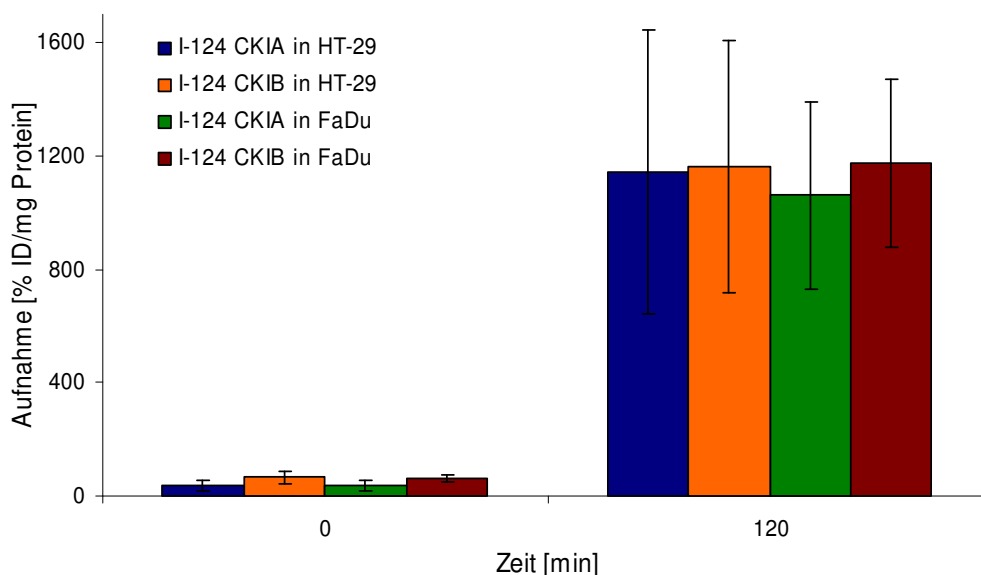
### 3.4.3 Bestimmung der *in vitro*-Zellaufnahme an HT-29 und FaDu Zelllinien<sup>10</sup>

Die Untersuchung der *in vitro*-Zellaufnahme an den beiden Zelllinien lässt erste Vermutungen über das Verhalten des Tracers *in vivo* zu. Da sich vor allem die inhibitorische Wirkung der beiden iodierten Verbindungen **CKIA** und **CKIB** in den

<sup>10</sup> Die Zellaufnahmestudien wurden freundlicherweise von Frau DC F. Graf durchgeführt

Zellzyklusanalysen mittels FACS als sehr hoch erwies, sollte eine hohe Zellaufnahme erreichbar sein. Da die Cdk4 im Zellkern lokalisiert ist, muss die Verbindung in den Zellkern aufgenommen werden, um ihre Wirkung zu entfalten.

Die Zellaufnahmeuntersuchungen fanden an den als Monolayer kultivierten Zellen bei 4 °C und 37 °C statt. Die Ergebnisse der Zellaufnahme der  $^{124}\text{I}$ -markierten Verbindungen in % der injizierten Dosis pro mg Protein bei 37 °C sind in Abbildung 85 aufgeführt.

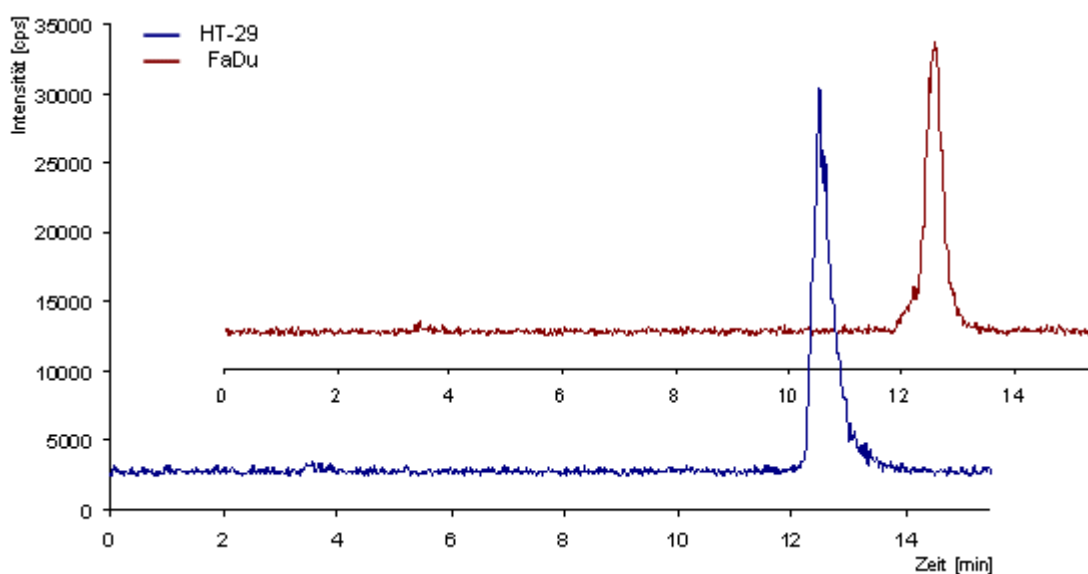


**Abbildung 85: Zelluläre Radiotraceraufnahme von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB bei 37 °C [%ID/mg Protein]**

Die Untersuchung der zellulären Radiotraceraufnahme zeigt vor allem für die Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB hohe Werte von über 1000%ID/mg Protein (Abbildung 85). Interessanterweise zeigte sich bei einer Temperatur von 4 °C eine wesentlich geringere Zellaufnahme. So wurden z.B. für [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA Werte von  $258 \pm 30\%$  ID/mg Protein in HT-29-Zellen und  $169 \pm 14\%$  ID/mg Protein in FaDu-Zellen gemessen. Die Aufnahme der radiomarkierten Verbindung erfolgt anscheinend zu einem hohen Anteil energieabhängig. Die beteiligten Aufnahmemechanismen wurden allerdings nicht identifiziert. Auch in der Literatur finden sich keine Angaben zur Aufnahme der Verbindungen in die Zelle. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Inhibitoren zum ATP-Molekül ist eine Aufnahme über Transportsysteme, die Nukleoside in die Zelle befördern, denkbar.

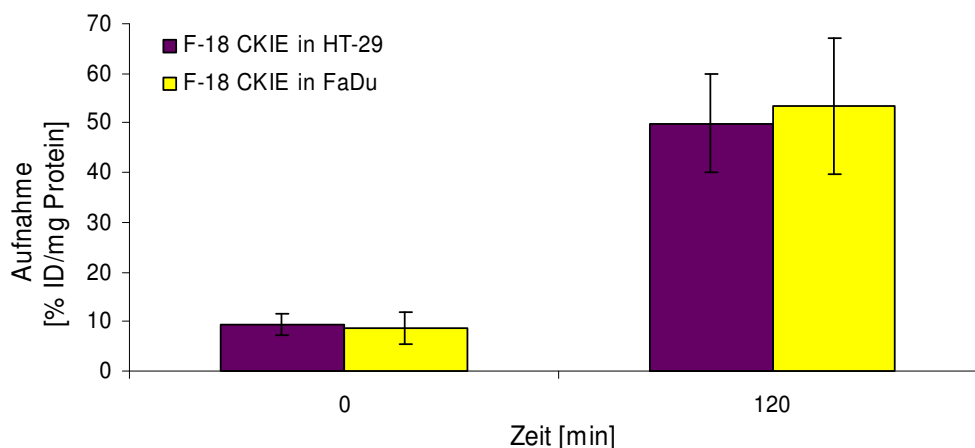
Um sicherzustellen, dass es sich bei der aufgenommenen Verbindung um den jeweiligen Inhibitor handelt und nicht um einen Metabolit, wurde die Stabilität der Verbindung nach der Inkubation mit den Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen

nach 60 min Inkubation bei 37°C mit Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von Methanol gefällt. Die unlöslichen Zellbestandteile konnten dann durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Aktivitätsbilanz zeigte, dass sich die radioaktiv markierte Substanz im Überstand befindet. Im Sediment konnte keine radioaktiv markierte Substanz bestimmt werden. Der Überstand wurde abgenommen und mittels HPLC untersucht. Es wurde eine Stabilität der jeweiligen radioaktiv markierten Inhibitoren von >90% festgestellt (Abbildung 86). Damit ist auszuschließen, dass es sich bei der aufgenommenen Verbindung um einen Metabolit handelt.



**Abbildung 86: Analytische HPLC-Radiochromatogramme von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA nach 60 min Inkubation in den Zelllinien HT-29 und FaDu**

Die Abbildung 87 zeigt die Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE.



**Abbildung 87: Zelluläre Radiotraceraufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE bei 37 °C [%ID/mg Protein]**

Für diese Verbindung konnte eine Zellaufnahme von  $50 \pm 10\%$  ID/mg Protein für HT-29 und  $53 \pm 14\%$  ID/mg Protein für FaDu-Zellen nach 2 h und festgestellt werden, es werden aber nicht so hohe Werte wie für die radioiodierten Verbindungen erreicht.

Ein Vergleich der Daten mit Aufnahmewerten, die für [ $^{18}\text{F}$ ]FDG erzielt werden, zeigt, dass die Aufnahme trotzdem für eine *in vivo*-Anwendung ausreichend ist. [ $^{18}\text{F}$ ]FDG ist ein etablierter Radiotracer, der in der Medizin zur Diagnose von Tumoren über ihren erhöhten Glucosebedarf eingesetzt wird. Bei Inkubation beider Zelllinien mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG im glucosefreien Medium kann nach 2 h zwar eine Zellaufnahme von 350-500% ID/mg Protein für HT-29 und 850-900% ID/mg Protein für FaDu<sup>11</sup> beobachtet werden, allerdings spiegeln diese Werte nicht die realen Zustände bei der *in vivo*-Anwendung wider, da sich im Blut eines Menschen immer Glucose befindet. Der natürliche Blutglucosespiegel eines Menschen liegt durchschnittlich bei 4-5 mmol/l [193]. Dadurch kommt es bei der Aufnahme des Radiotracers in die Zelle zur Konkurrenz mit nicht radioaktiv markierter Glucose. Diese Konkurrenz wird im Zellmodell häufig durch Zugabe von 2-3 g/l Glucose simuliert. Die [ $^{18}\text{F}$ ]FDG Aufnahme in HT-29 Zellen bei Verwendung eines 16 mmol/l Glucose enthaltenden Mediums liegt nach 2 h bei 18-21% ID/mg Protein, für FaDu Zellen wird unter Zugabe von 11 mmol/l ein Wert von 20-25% ID/mg Protein nach 2 h erreicht<sup>11</sup>. Diese Werte zeigen ein realistisches Bild der vermutlich erzielten Zellaufnahme im Patienten. Die für [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE erzielten Werte sind höher, woraus geschlossen werden kann, dass die Aufnahme des Tracers in die Zelle für eine *in vivo*-Anwendung ausreichend sein könnte.

Die geringere Aufnahme der Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE in die Zelle kann durch die unterschiedliche Struktur der Verbindung im Vergleich zu [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB bedingt sein. Da bisher nicht geklärt wurde, ob die Aufnahme Transporter-vermittelt abläuft, könnte die niedrigere Aufnahme an einer geringeren Interaktion des [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE mit dem potentiellen Transporter liegen.

Im Molekül wurden zur Änderung der Lipophilie und zur Radiomarkierung einige Strukturmodifizierungen (Methylketon gegen Iodid, fluoralkyliertes Piperazin) vorgenommen. Dadurch kommt es zu einer anderen Verteilung der lipophilen und hydrophilen Gruppen in der Verbindung **CKIE** im Vergleich zum **CKIA** und **CKIB**. Das Iod in Position 6 führte zu einer stark lipophilen Ausrichtung dieser Seite des Moleküls. Die Einführung des Methylketons in Verbindung **CKIE** senkt die Lipophilie auf dieser Seite des Moleküls stark ab. Im Gegensatz dazu führt die Einführung der Fluorethylgruppe zu einer höheren Lipophilie der Seitenkette. Des Weiteren muss bei

---

<sup>11</sup> interne Ergebnisse, Institut für Radiopharmazie, Abteilung Radiopharmazeutische Biologie

einem Vergleich der Aufnahme von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA/B mit der Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE auch die spezifische Aktivität und die Halbwertszeit des Radionuklids berücksichtigt werden.

Alle drei Verbindungen zeigen eine ausreichend hohe Zellaufnahme. Mit den beiden Voruntersuchungen, der Bestimmung der *in vitro*-Stabilität und der zellulären Radiotraceraufnahme, konnten wichtige Grundvoraussetzungen für die *in vivo*-Untersuchungen erfüllt werden. Die Verbindungen sind stabil und werden in die Zellen aufgenommen. Die Zellaufnahme an den verwendeten Monolayermodellen kann allerdings nur Indizien für den Metabolismus *in vivo* bieten. Dieser lässt sich aus den bisherigen Untersuchungen nur bedingt vorhersagen, da Monolayer-Kulturen die räumliche Struktur und damit komplexe Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen fehlen und die Monolayerzellen im Unterschied zu Zellen *in vivo* alle den gleichen Bedingungen, wie Sauerstoff- und Nährstoffangebot, ausgesetzt sind [194].

Um die Eignung der Substanzen als Radiotracer umfassend zu untersuchen sind *in vivo*-Untersuchungen unumgänglich. Als eine wichtige Voraussetzung stellt sich dabei die Stabilität einer Verbindung *in vivo* dar, da sich der Metabolismus einer Verbindung im *in vitro*-Modell von den realen Vorgängen unterscheidet.

### 3.4.4 Bestimmung der *in vivo*-Stabilität in Wistar-Ratten<sup>12</sup>

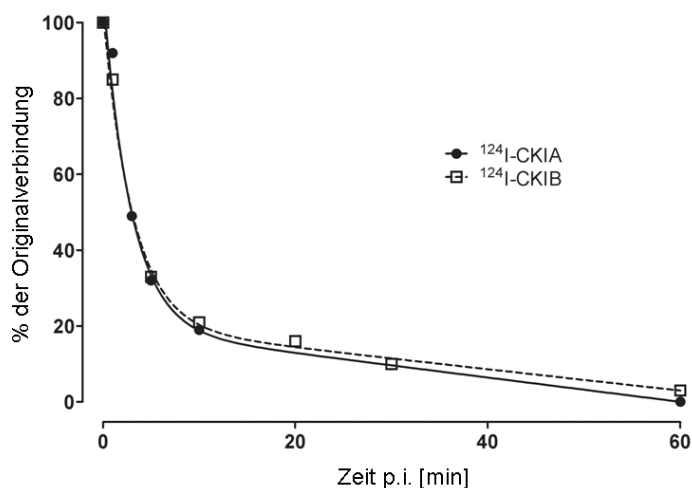
Die vielversprechenden Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen forcierten nun Studien zum *in vivo*-Verhalten. Die Experimente zur Bestimmung der *in vivo*-Stabilität in Ratten liefern wichtige Aussagen über die Verfügbarkeit der Verbindung im Blut und können damit Rückschlüsse auf eine Anreicherung im Zielgewebe ermöglichen. Ist die Verbindung über einen längeren Zeitraum im Blut stabil, kann es zu einer Interaktion mit dem Zielgewebe kommen. Eine hohe Metabolisierungsrate der Verbindung im Blut limitiert die Anreicherung im Zielgewebe.

Um die Stabilität *in vivo* zu untersuchen, wurden die Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA, [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE über die Schwanzvene in Wistar-Ratten injiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Blutproben entnommen und zur Abtrennung der festen Bestandteile zentrifugiert. Das so erhaltene Plasma enthielt sämtliche radioaktiv markierte Substanzen und wurde mittels HPLC untersucht.

Abbildung 88 zeigt den Anteil der Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA, [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE in Abhängigkeit von der Zeit im Plasma der Ratten nach einer einzelnen intravenösen Injektion.

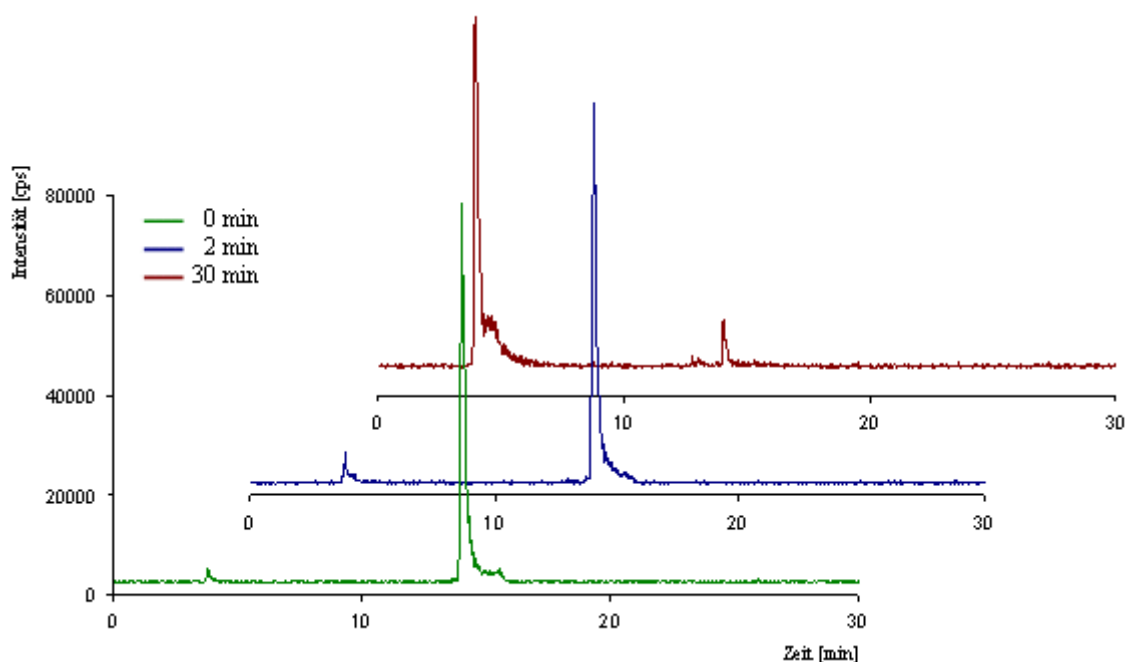
---

<sup>12</sup> Die Stabilitätsuntersuchungen wurden freundlicherweise von Frau A. Suhr durchgeführt



**Abbildung 88:** Metabolische *in vivo*-Stabilität der Verbindungen  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  und  $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$  im Plasma der Ratten

Beide iodierten Verbindungen zeigen eine vergleichbare metabolische Stabilität. Die Untersuchung ergab, dass beide Verbindungen schnell metabolisiert werden (Abbildung 88). Nach 10 min wurde nur noch ein Anteil von 19% ( $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$ ) bzw. 21% ( $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$ ) der Ausgangsverbindungen registriert. Beide Verbindungen sind nach 60 min p.i. fast vollständig metabolisiert, es wurde noch ein Anteil von maximal 5%  $[^{124}\text{I}]\text{CKIA}$  und  $[^{124}\text{I}]\text{CKIB}$  detektiert. In den HPLC-Analysen ließen sich zwei neue hydrophilere Verbindungen feststellen, die allerdings nicht charakterisiert wurden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer ersten Stabilitätsuntersuchung zum  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  (Abbildung 89).



**Abbildung 89:** HPLC-Radiochromatogramme von  $[^{18}\text{F}]\text{CKIE}$  nach der Inkubation im Blut für 2 und 30 min, sowie der Ausgangssubstanz (0 min)

Dabei konnte nach 2 min noch ein Großteil der Aktivität im Blut der Verbindung [**<sup>18</sup>FCKIE** zugeordnet werden. Nach 30 min wurden nur noch 8% [**<sup>18</sup>FCKIE im Blut gefunden. Die entstehenden Metaboliten wurden nicht charakterisiert.**

Metaboliten entstehen vorrangig durch enzymatisch verursachte Veränderungen, wobei es einerseits zum Abbau durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse kommen kann, andererseits können kleinere polare Moleküle wie Zucker, Sulfate oder Aminosäuren durch Enzyme kovalent an den radioaktiven Inhibitor gebunden werden. Metaboliten, die bei der Anwendung radiohalogenierter Verbindungen entstehen können, sind die Radiohalogenide selbst, da Dehalogenasen ubiquitär im Organismus vorkommen. Die Stabilität der eingesetzten Verbindung hängt in dem Fall vorrangig davon ab, wie gut und wie schnell diese Enzyme die jeweilige Verbindung spalten können. Dieser Prozess ist allerdings auch stark von der Spezies abhängig. Es besteht ein metabolischer Unterschied zwischen der hypermetabolischen Ratte und z.B. dem Mensch, da jede Spezies eine unterschiedliche Enzymaktivität aufweist. Aufgrund dessen ist es möglich, dass sich die beobachtete, starke Zersetzung nur im Tiermodell Ratte zeigt und die Verbindungen in anderen Modellen, wie der Maus eine höhere Stabilität aufweisen und somit eine Anwendung als Radiotracer erlauben. Um das Verhalten der Substanzen im Mensch besser vorhersagen zu können, wären auch Untersuchungen am Affen sinnvoll. Für die radioiodierten Verbindungen stehen dabei die Organe Schilddrüse und Magen im Fokus, da sich eine *in vivo*-Deiodierung anhand einer erhöhten Aufnahme von Radioiod in die Schilddrüsen und den Magen feststellen lässt [195]. Eine Radiodefluorierung hingegen lässt sich durch eine Einlagerung der Aktivität im Skelett belegen, da es zur Anreicherung in den Knochen kommt und damit im Laufe der Untersuchung zur immer deutlicheren Abbildung des Skeletts des Versuchstiers. Die Kalziumionen des Hydroxylapatits der Knochen bilden starke ionische Wechselwirkungen zu dem freien Fluorid aus und es wird in die Knochenstruktur eingelagert.

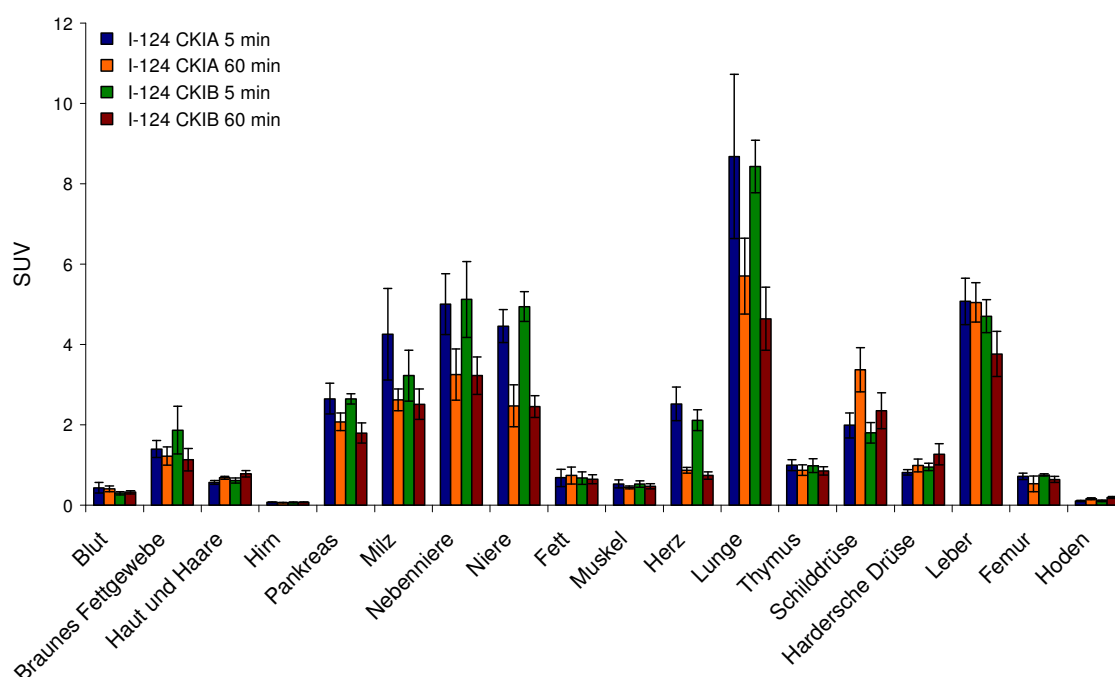
### 3.4.5 Untersuchung zur Bioverteilung in Wistar-Ratten<sup>13</sup>

In orientierenden Untersuchungen zur Bioverteilung der radioiodierten Verbindungen [**<sup>124</sup>ICKIA/B** in normalen männlichen Wistar-Ratten konnten erste Erkenntnisse zur Metabolisierung und Elimination der iodierten Radiotracer gewonnen werden.

---

<sup>13</sup> Die Bioverteilungsuntersuchungen wurden freundlicherweise von Frau R. Herrlich durchgeführt

Dazu wurde den fünf bis sechs Wochen alten Tieren [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA oder [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB injiziert. Die Tiere wurden fünf bzw. 60 Minuten nach Injektion unter Etheranästhesie durch Herzpunktion getötet, Blut und Organe wurden isoliert, ausgewogen und die Aktivität bestimmt. Die akkumulierte Radioaktivität ausgewählter Gewebe und Organe wird hierbei als standardisierter Aufnahmewert (SUV) angegeben. Abbildung 90 zeigt den Vergleich der Bioverteilung der radiomarkierten Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB nach fünf und 60 Minuten.



**Abbildung 90: Bioverteilung von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB in ausgewählten Geweben und Organen von normalen männlichen Wistar-Ratten (Gewicht  $180 \pm 20$  g) nach 5 min und 60 min** SUV = (Organaktivität/Organgewicht)/(injizierte Aktivität/ Gesamtgewicht); Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung; n = 8

Beide Radiotracer zeigen trotz ihrer unterschiedlichen Lipophilie ein ähnliches Verteilungsprofil *in vivo*. Nach 5 min werden hohe Mengen an [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA bzw. [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB in der Lunge ( $8,67 \pm 2,04$  für [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und  $8,43 \pm 0,66$  für [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB) gemessen. Dabei kann über eine Aufnahme durch die in der Lunge vorkommenden Makrophagen spekuliert werden [142]. Auch in der Milz, Niere, Nebenniere und Leber wird eine hohe Akkumulation ermittelt (SUV > 3,2). Nach 60 min lässt sich eine Verringerung der Anreicherung in diesen Organen feststellen, wobei die weniger lipophile Verbindung [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB schneller aus diesen Organen eliminiert wird als [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA. Es findet keine Aufnahme der Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB in das Gehirn statt. Das lässt darauf schließen, dass beide Verbindungen die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren oder dass sie Substrate der P-Glykoprotein Effluxpumpe sind



und somit schnell wieder aus dem Hirn eliminiert werden. Beim Vergleich der Daten nach fünf und 60 min lässt sich für fast alle Organe eine Verringerung der aufgenommenen Aktivitätsmenge nach 60 min feststellen, mit Ausnahme der Schilddrüse. Die Aktivitätsmenge steigt mit der Zeit weiter an, was auf eine *in vivo*-Radiodeiodierung zurückzuführen ist. Die Ergebnisse zeigen also, dass es sich bei einem der Metaboliten, die in den *in vivo*-Stabilitätsuntersuchungen gefundenen wurden, um freies [ $^{124}\text{I}$ ]Iodid handelt. Die Daten der Bioverteilungsuntersuchung lassen außerdem auf eine schnelle, vorrangig hepatobiliäre Eliminierung des Radiotracers aus dem Versuchstier schließen. Dieses Eliminationsprofil wird durch die relativ hohe Lipophilie der Verbindungen begünstigt.

### 3.4.6 Bewertung der Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA, [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE als Radiotracer

Im Rahmen der durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen wurden erste Erkenntnisse zur Anwendung der radioaktiven Verbindungen erhalten. Die Bestimmung der *in vitro*-Stabilität, der zellulären Radiotraceraufnahme mit den Tumorzelllinien HT-29 und FaDu und der inhibitorischen Wirkung auf den Zellzyklus mittels FACS wurde erfolgreich durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Verbindungen in der Lage sind, den Zellzyklusarrest in der  $G_1/G_0$ -Phase zu induzieren und eine für *in vitro*-Anwendungen ausreichende Stabilität in verschiedenen Medien aufweisen. Es bestätigte sich, dass die radioiodierten Verbindungen zu einem hohen Prozentsatz in die Zelle aufgenommen werden. Die unterschiedlich hohe Aufnahme bei 4°C und 37°C lässt vermuten, dass die Verbindungen durch einen bisher nicht identifizierten Transportprozess in die Zelle aufgenommen werden. Eine Anwendung der Verbindungen *in vitro*, um neue Erkenntnisse bezüglich Cdk4-vermittelter Stoffwechselprozesse zu erhalten, ist somit möglich. So könnten im weiteren Verlauf z.B. Erkenntnisse über die beteiligten Transportsysteme bei der Aufnahme der Inhibitoren in die Zelle gewonnen werden. Wenn die Verbindung über ein Transportsystem in die Zelle gebracht wird, ist es möglich, dass eine Verteilung der hydrophilen und lipophilen Gruppen im Molekül, wie sie die radioiodierten Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB aufweisen, für eine bessere Aufnahme sorgt. Die verringerte Aufnahme des [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE im Vergleich zu den radioiodierten Verbindungen gibt erste Hinweise darauf, dass die funktionellen Gruppen des Moleküls die Zellaufnahme signifikant beeinflussen.

Alle drei Verbindungen zeigen in den *in vivo*-Untersuchungen jedoch Limitationen hinsichtlich ihrer Eignung als Radiotracer. Es stellte sich anhand der Ergebnisse heraus, dass die Verbindungen eine sehr geringe metabolische Stabilität aufweisen. Aufgrund der geringen Stabilität kann nur ein geringer Prozentsatz der Substanz zum Wirkort gelangen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur metabolischen Stabilität *in vivo* lassen keine Rückschlüsse auf die Struktur der Metaboliten zu. Die für die radiopharmakologischen Untersuchungen applizierten Substanzmengen im nM-Bereich sind zu gering, um eine Strukturanalyse mittels gängiger Analysemethoden, wie z.B. NMR oder Elementaranalyse zu ermöglichen. Für zukünftige Arbeiten ist es wichtig, die entstehenden Metaboliten zu identifizieren. Durch eine Strukturaufklärung der Metaboliten wäre es möglich, die instabilen bzw. reaktiven Stellen im Ausgangsmolekül zu lokalisieren. Auf Basis dieser Ergebnisse könnten dann Informationen über eine Stabilisierung der Inhibitoren gewonnen und somit neue potentielle Inhibitoren mit erhöhter metabolischer Stabilität erzeugt werden.

Über die beiden literaturbekannten Verbindungen PD 0183812 und PD 0332991 mit dem Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Grundgerüst (vgl. 1.4), die sich beide bereits in der Phase der klinischen Untersuchung befinden, wurden keine Stabilitätsuntersuchungen veröffentlicht. Da beide Verbindungen allerdings bereits im Tiermodell zellzyklusarretierende Wirkung zeigten und einen Rückgang von Tumoren bewirkten [9, 10], liegt die Vermutung nahe, dass beide Verbindungen eine für die pharmakologische Anwendung ausreichende Stabilität aufweisen. Allerdings kann sich der Metabolismus einer Verbindungen durch die Gabe einer höheren Stoffmenge verändern, d.h. es besteht die Möglichkeit, dass der Anteil an Metabolit im Vergleich zur Ausgangssubstanz geringer ausfällt, als bei der Gabe einer wesentlich geringeren Dosis. Da der Metabolismus einer Substanz vorrangig von der Aktivität der abbauenden Enzyme abhängt, hat die Stoffmenge der verabreichten Substanz einen großen Einfluss auf die Bildung von Metaboliten. Kommt es zur Sättigung des betreffenden Enzyms, wird die überschüssige Substanz nicht abgebaut.

In den ersten Untersuchungen zur Bioverteilung zeigte sich, dass es zu einer *in vivo*-Deiodierung kommt, da eine mit der Zeit zunehmende Akkumulation der Aktivität in der Schilddrüse beobachtet werden konnte. Obwohl eine Iod-Kohlenstoffbindung an konjugierte Systeme als sehr stabil beschrieben wird [88], zeigen ähnliche in der Literatur vorgestellte Iodverbindungen ebenfalls eine *in vivo*-Deiodierung [196, 197]. In der Literatur wird auch die *in vivo*-Deiodierung bei aromatischen Iodverbindungen beobachtet [198, 199]. Die vorliegende Bindung des Iods an das konjugierte

Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Grundgerüst bietet eine höhere Stabilität als z.B. aliphatisch gebundenes Iod [88]. Aufgrund der chemischen Eigenschaften der Iod-Kohlenstoffbindungen kann eine *in vivo*-Deiodierung nie vollständig ausgeschlossen werden. Desweiteren wird in der Literatur bei der Anwendung von  $^{124}\text{I}$ -markierten Verbindungen für die molekulare Bildgebung häufig die "wash out"-Strategie angewendet [200-202]. Dabei erfolgt die PET-Untersuchung erst nach einer Wartezeit von ca. 10-24 h, in der entstehende Metabolite aus dem Körper eliminiert werden können. Diese Strategie könnte sich als sinnvoll erweisen, wenn die Verbindungen eine ausreichend hohe Tumoranreicherung zeigen und die auftretenden Metaboliten schneller aus dem Körper eliminiert werden als der sich bereits im Zielorgan angereicherte Tracer [201]. Diese Strategie kann nur bei Verwendung längerlebiger Radionuklide wie  $^{124}\text{I}$  Einsatz finden, da bei einer Bildgebung nach 10-24 h noch ausreichend Aktivität im Organismus vorhanden sein muss, um aussagekräftige Daten zu erhalten.

Die Untersuchungen zur Bioverteilung zeigen weiterhin, dass sich die beiden Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB trotz ihrer unterschiedlichen Lipophilie *in vivo* ähnlich verteilen. Vor allem in der Leber lässt sich, begünstigt durch die Lipophilie der radioiodierten Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB, eine hohe Anreicherung feststellen. Die Ausscheidung der beiden Radiotracer erfolgt demnach zum großen Teil hepatobiliär. Die Lipophilie der Verbindungen spielte schon beim Design und der Auswahl der Verbindungen eine große Rolle, da sie die Verteilung im Körper und die Elimination beeinflusst.

Für die fluoridierte Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE liegen bisher noch keine Daten zur Bioverteilung vor. Allerdings zeigten die Untersuchungen der Zellaufnahme, dass eine kleine strukturelle Änderung der Verbindung bereits zu einer großen Veränderung des Metabolismus führen kann.

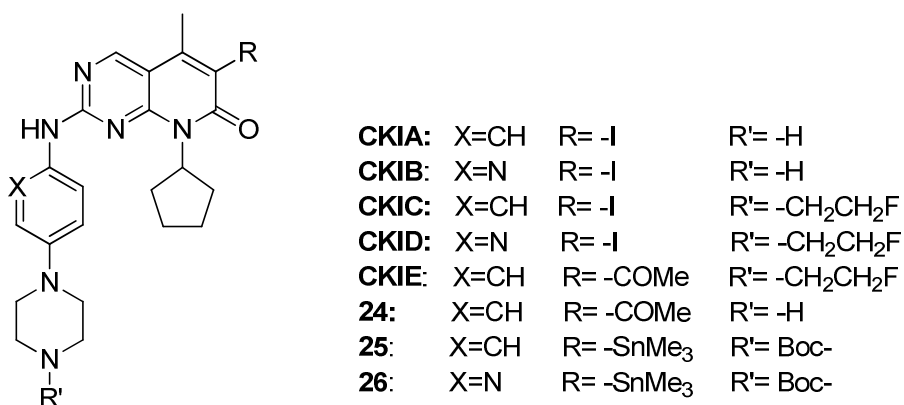
Alle drei bereits radiomarkierten Verbindungen müssen des Weiteren in geeigneten *in vivo*-Modellen hinsichtlich ihrer Anreicherung in tumorigen Geweben untersucht werden. Die am normalen Wistar-Ratten-Modell festgestellte geringe metabolische Stabilität muss in Bioverteilungs- und PET-Untersuchungen an tumortragenden Tieren verifiziert werden. Der Metabolismus und die Verteilung der Substanzen muss aufgrund der genetischen Unterschiede in verschiedenen Spezies untersucht werden, um eine entgeltliche Aussage treffen zu können. Die Eignung dieser drei Verbindungen als Radiotracer kann erst nach Abschluss dieser Experimente entgeltlich beurteilt werden.

## 4. Zusammenfassung

Im Rahmen der Promotion sollten neue Ansätze zur funktionellen Tumorcharakterisierung auf der Grundlage der Cyklin-abhängigen Kinasen 4/6 (Cdk4/6) untersucht werden. Dazu stand die Entwicklung von radioaktiv markierten Inhibitoren der Cdk4/6 als Radiotracer im Vordergrund. Zusätzlich sollten Untersuchungen zur (radio-)pharmakologischen Charakterisierung der radiomarkierten Verbindungen in Kooperation mit der Abteilung „Radiopharmazeutische Biologie“ erfolgen, um erste Aussagen zur Eignung der dargestellten Verbindungen als Radiotracer treffen zu können.

Die aus der Literatur bekannte Leitstruktur mit Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-Grundgerüst zur Inhibierung von Cdk4/6 wurde für die Entwicklung der radioaktiv markierten Inhibitoren genutzt. Es gelang, eine aus der Literatur bekannte Verbindung (**CKIA**, [13]) sowie vier neue Verbindungen (**CKIB-E**) als Referenzsubstanzen darzustellen, sowie für die jeweilige Radiomarkierungsstrategie geeignete Markierungsvorstufen (**24**, **25**, **26**).

Die bereits bekannten Syntheserouten [13] mussten dazu optimiert und an die vorliegenden Bedingungen angepasst werden. Für neue Verbindungen, wie die fluorethylierten Substanzen **CKIC-E** mussten neue Reaktionswege gefunden werden. Die synthetisierten Referenzsubstanzen und Markierungsvorstufen zeigt Abbildung 91.



**Abbildung 91: Dargestellte Referenzsubstanzen und Markierungsvorstufen**

Alle acht Verbindungen ließen sich in bis zu 12-stufigen Synthesen in moderaten Ausbeuten darstellen (Tabelle 23).

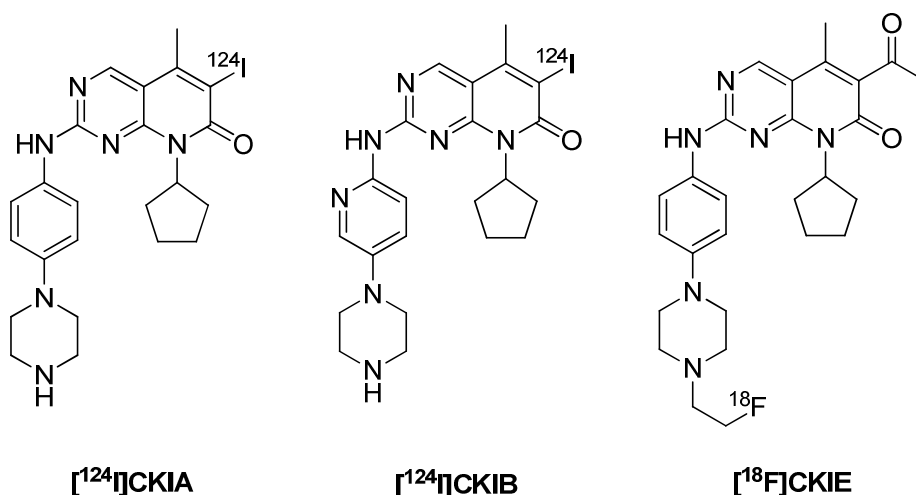
**Tabelle 23: Gesamtausbeuten der dargestellten Verbindungen**

	Bezeichnung	X	R	R'	Ausbeute [%]
<b>Inhibitoren</b>	<b>CKIA</b>	CH	-I	-H	7,2
	<b>CKIB</b>	N	-I	-H	3,6
	<b>CKIC</b>	CH	-I	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	1,4
	<b>CKID</b>	N	-I	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	1,1
	<b>CKIE</b>	CH	-COMe	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	0,8
<b>Markierungs- vorstufen</b>	<b>24</b>	CH	-COMe	-H	4,2
	<b>25</b>	CH	-SnMe <sub>3</sub>	Boc-	2,3
	<b>26</b>	N	-SnMe <sub>3</sub>	Boc-	2,0

Tabelle 23 gibt die Gesamtausbeuten an, die über sämtliche Reaktionsschritte unter Vernachlässigung der Darstellung der Phenyl-/Pyridyl-piperazin-Seitenketten (**7**, **9**) erhalten wurden. Die Darstellung der Referenzsubstanzen und Markierungsvorstufen gestaltete sich als sehr aufwendig. Einige Zwischenprodukte konnten nur in geringen Ausbeuten erhalten werden. Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen war unumgänglich, da ausreichend Substanzmenge für analytische und (radio-)pharmakologische Untersuchungen hergestellt werden musste. Mittels der in dieser Arbeit vorgestellten Syntheserouten lassen sich die Referenzverbindungen in guten Ausbeuten und hoher Reinheit herstellen. Auch pharmakologische Untersuchungen, wie die Untersuchung mittels Durchflusszytometrie waren möglich. Die Darstellung der verschiedenen Markierungsvorstufen konnte ebenfalls optimiert werden.

Die dargestellten Referenzverbindungen **CKIA-E** wurden mittels Durchflusszytometrie an den Zelllinien HT-29 und FaDu auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht. Die beiden Verbindungen **CKIC** und **CKID** weisen nur eine sehr schwache inhibitorische Wirkung auf. Die Untersuchungen der Verbindungen **CKIA/B/E** hingegen belegten, dass ein Zellzyklusarrest unter Einwirkung der Inhibitoren erreichbar ist. Die weiteren Untersuchungen zur Radiomarkierbarkeit sowie anschließende radiopharmakologische Evaluationen wurden dementsprechend an den Verbindungen **CKIA**, **CKIB** und **CKIE** durchgeführt.

Die Radiomarkierungen der drei Verbindungen **24**, **25** und **26** mit <sup>124</sup>I und <sup>18</sup>F zur Darstellung der Inhibitoren [<sup>124</sup>I]**CKIA/B** und [<sup>18</sup>F]**CKIE** (Abbildung 92) konnten optimiert und erfolgreich durchgeführt werden.



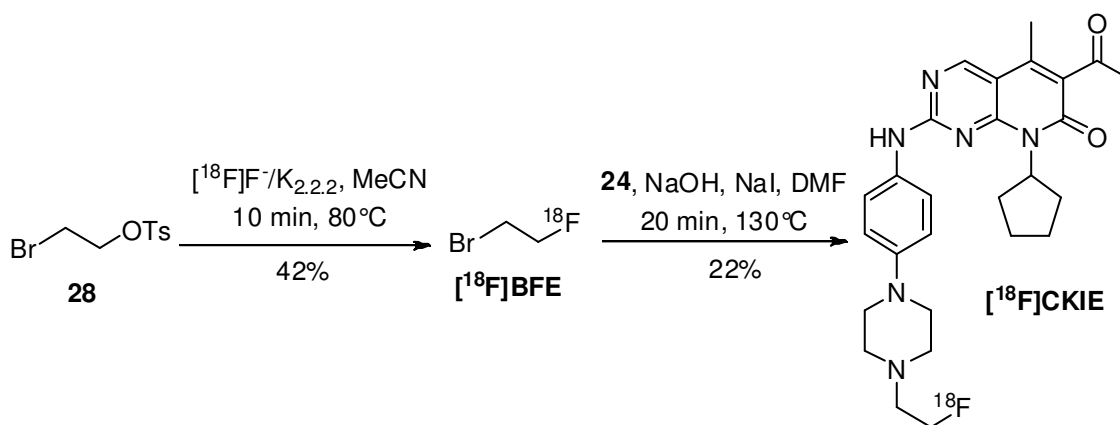
**Abbildung 92: Strukturen der drei radioaktiv markierten Inhibitoren [<sup>124</sup>I]CKIA/B und [<sup>18</sup>F]CKIE**

Die Darstellung der Verbindungen [<sup>124</sup>I]CKIA und [<sup>124</sup>I]CKIB erfolgte in zwei Schritten durch elektrophile Substitution mittels regioselektiver Destannylierung und anschließender Abspaltung der Schutzgruppe. Tabelle 24 fasst die optimalen Bedingungen der Radioiodierung zusammen.

**Tabelle 24: optimale Bedingungen der Radioiodierung**

<sup>124</sup> I-Iodierung:	100-200 µg <b>25</b> bzw. <b>26</b> , 50 µl DMSO, 100 µl Methanol (5% Eisessig), 10 µl [ <sup>124</sup> I]NaI in ca. 0,1 M NaOH, RT, 10 min, Iodotube™
Entschützung:	200 µl TFA, 50 °C, 20 min

Die Darstellung der fluorethylierten Verbindung erfolgte ebenfalls über eine Zwei-Schritt-Synthese (Abbildung 93), beginnend mit der Synthese des Markierungsbausteins [<sup>18</sup>F]BFE aus der Tosylmarkierungsvorstufe **28**.



**Abbildung 93: Darstellung von [<sup>18</sup>F]CKIE über eine Zwei-Schritt/Zwei-Topf-Synthese**

Die zur Markierung des sekundären Amins zur Auswahl stehenden Markierungsbausteine [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethyltosylat ([ $^{18}\text{F}$ ]FETos) und [ $^{18}\text{F}$ ]Bromfluorethan ([ $^{18}\text{F}$ ]BFE) wurden auf ihre Eignung untersucht, ebenso wie die Auswahl einer geeigneten Markierungsvorstufe für die Darstellung des Markierungsbausteins. Tabelle 25 zeigt die optimierten Markierungsbedingungen der  $^{18}\text{F}$ -Fluorierungen.

**Tabelle 25: Markierungsbedingungen für die Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE**

[ $^{18}\text{F}$ ]BFE	5 mg <b>28</b> , 1 ml MeCN, 10 min, 80 °C
[ $^{18}\text{F}$ ]CKIE	6,5 mg <b>24</b> , 9,0 mg NaI, 10 $\mu\text{l}$ 1 M NaOH, 0,7 ml DMF, 20 min, 130 °C

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse der Radiosynthesen aller drei Verbindungen zusammengestellt.

**Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der Radiomarkierung.**

	[ $^{124}\text{I}$ ]CKIA	[ $^{124}\text{I}$ ]CKIB	[ $^{18}\text{F}$ ]CKIE
Masse	0,25 mg	0,25 mg	6 mg
Markierungsvorstufe			
Synthesedauer	ca. 100 min	ca. 100 min	ca. 125 min
Aktivität Produkt	8,5-35,7 MBq	7,5-32,7 MBq	100-368 MBq
RCA	24-34 %	17-27 %	< 9%
RCR	> 98%	> 98%	> 98%
spezifische Aktivität ( $\emptyset$ )	17 GBq/ $\mu\text{mol}$	22 GBq/ $\mu\text{mol}$	22,5 GBq/ $\mu\text{mol}$
logD <sub>7,4</sub> (experimentell)	2,76 $\pm$ 0,11	2,00 $\pm$ 0,04	2,21 $\pm$ 0,04

Alle drei radiomarkierten Verbindungen ließen sich in ausreichenden Ausbeuten in hoher Reinheit darstellen. Die optimierten Syntheserouten ermöglichten die Isolierung der Produkte in ausreichendem Aktivitätsniveau für die geplanten radiopharmakologischen Untersuchungen dieser Substanzen. Neben der Bestimmung der spezifischen Aktivität und der Lipophilie der Verbindungen, fanden Zellaufnahmeuntersuchungen und Bestimmungen zur Stabilität der Verbindungen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* statt. Die radioiodierten Verbindungen wurden des Weiteren für Untersuchungen zur Bioverteilung in normalen männlichen Wistar-Ratten genutzt. Für alle drei Verbindungen konnte eine sehr hohe *in vitro*-Stabilität in Ethanol, PBS (pH = 7,4), Zellkulturmedium und Rattenplasma festgestellt werden, die die Voraussetzung für weitere Untersuchungen am Zellmodell war. Die Zellaufnahmeuntersuchungen zeigten vor allem für die Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB eine beträchtliche Zellaufnahme von über 1000% ID/mg Protein nach 2 h. Die Zellaufnahme der Verbindung **CKIE** ist geringer als die der anderen beiden

Verbindungen. Trotzdem ist die zelluläre Radiotraceraufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE für eine *in vivo*-Anwendung ausreichend hoch. Die Untersuchung der *in vivo*-Stabilität der Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA, [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE in Blutproben von Wistar-Ratten ergab allerdings, dass alle Verbindungen schnell metabolisiert werden. Die Untersuchung der Bioverteilung der radioiodierten Verbindungen belegen eine *in vivo* Radiodeiodierung sowie eine hauptsächlich hepatobiliäre Ausscheidung.

Im Hinblick auf eine Anwendung als Radiotracer konnten im Rahmen dieser Arbeit folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- (A) Die Synthese aller Inhibitoren und Markierungsvorstufen ist trotz sehr aufwendiger Synthesen in ausreichenden Ausbeuten möglich.
- (B) Die dargestellten Verbindungen sind in der Lage, den Zellarrest in der  $G_1/G_0$ -Phase zu induzieren. Aufgrund ihrer hohen inhibitorischen Wirkung wurden die drei Verbindungen **CKIA**, **CKIB** und **CKIE** für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.
- (C) Die Radiomarkierung der Markierungsvorstufen **24**, **25** und **26** liefern die radiomarkierten Inhibitoren [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA, [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE mit reproduzierbarer Ausbeute in hoher radiochemischer Reinheit und ausreichender spezifischer Aktivität. Die Herstellung der Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE im automatisierten Modul erfordert weitere Untersuchungen.
- (D) Die radiomarkierten Inhibitoren zeigen eine hohe *in vitro*-Stabilität und werden vermutlich energieabhängig in die Zelle aufgenommen.
- (E) Anhand der Stabilitätsuntersuchungen *in vivo* wurde gezeigt, dass alle drei Verbindungen *in vivo* nicht lange stabil sind. So kommt es beispielsweise bei den radioiodierten Verbindungen zur *in vivo*-Deiodierung.
- (F) Die Verbindungen werden sehr schnell hepatobiliär eliminiert.

Mit den dargestellten Verbindungen wurden erste Beiträge zur Untersuchung der Zellzyklus-regulierenden Kinasen Cdk4/6 im Zellmodell erhalten. Die Ergebnisse bestätigen, dass radiomarkierte Cdk4/6-Inhibitoren eine neue, vielversprechende Substanzklasse zur Aufklärung des Metabolismus der Cdk4/6 *in vivo* darstellen können. Die Hypothese, dass sich radioaktiv markierte Cdk4/6-Inhibitoren für die Charakterisierung von Tumoren eignen, kann allerdings noch nicht abschließend beantwortet werden.





## **6. Material und Methoden**

### **6.1 Material**

#### **6.1.1 Geräte**

Gerät / Material:	Bezeichnung / Firma / Spezifikation:
Rotationsverdampfer	Heidolph Laborota 400
Heizrührwerk	Heidolph MR 3001K
Vakuumpumpe	Vacuubrand 6 Drehschieber-Vakuumpumpe
DC-Kammer	CAMAG
Schmelzpunkt	Cambridge Instruments, Modell Galen III™
NMR-Spektroskopie	Varian Inova-400
Einwegspritzen	Braun
Einwegkanülen	Erosa
Kartusche 1	Fa. Waters, Sep-Pak® tC18Plus
Kartusche 2	Fa. Waters, Sep-Pak® Light Waters Accell™, Plus QMA
Kartusche 3	Macherey-Nagel, Chromabond ® HR-P
Zentrifuge	Mikro 20, Hettich
Minishaker	MS1 Minishaker, IKA
Synthesemodul	Nuclear Interface, bleiabgeschirmt
Gamma-Zähler	Cobra™ II
Pipetten	Mline BioHit, research Eppendorf (verschiedene Größen)
IoBind-Vials	Eppendorf
pH-Meter	Metrohm 713 pH Meter
Thermomixer	Eppendorf compact / comfort
Bas-Scanner	Bas-Scanner 2000; FujitsuSiemens
MALDI-MS	Autoflex II TOF/TOF, Bruker
ESI-MS	Quattro-Ultima, Micromass
NMR	UNITY INOVA 400, VARIAN
Analytische HPLC	VWR-Hitachi Elite LaChrom
Semipräp. HPLC (sl)	Jasco Systems
Semipräp. HPLC (sII)	Jasco PEEK Systems
Gamma-Messgerät	Cobra II gamma counter, Canberra-Packard, Meriden
Durchflusszytometer	FACSCalibur™ Flow Cytometer, Becton Dickinson

**Analytisches HPLC-System (a): VWR-Hitachi Elite LaChrom:**

Pumpe:	Pump L-2130
UV-Detektor:	UV-Detektor L-2400
Radioaktivitätsdetektor:	X-Ray-Test GABI
Autosampler:	L-2200
Software:	EZStart Vers. 3.1.7. build: 3.1.7.11

**Semipräparatives HPLC-System (sl): Jasco Systems**

Pumpe:	Jasco PU-1580 Intelligent HPLC Pump
UV-Detektor:	Jasco UV-1575 Intelligent UV/VIS Detektor
Entgaser:	DG-2080-53 3-line-Degasser
Radioaktivitätsdetektor:	X-Ray-Test GABI
Gradientenmischer:	LG-2080-02 Ternary Gradient Unit

**Semipräparatives HPLC-System (sII): Jasco PEEK Systems**

Pumpe:	Jasco PU-2080plus Intelligent HPLC Pump
UV-Detektor:	Jasco UV-2075 Intelligent UV/VIS Detektor
Entgaser:	DG-2080-53 3-line-Degasser
Radioaktivitätsdetektor:	Robotron 20046
Gradientenmischer:	Jasco LG 2080-02 Ternary Gradient Unit

**HPLC Chromatographiesäulen:**

<b>CI:</b>	Phenomenex RP-18 (LUNA C18(2) 4.60 × 250 mm, 5µm)
<b>CII:</b>	Phenomenex RP-18 (LUNA C18(2) 10 × 250 mm, 10µm)
<b>CIII:</b>	Supelco Discovery (C18 4.6×150 mm, 5 µm)
<b>CIV:</b>	Supelco Discovery (C18 10×250 mm, 5 µm)

**6.1.2 Chemikalien**

Verwendet wurden Chemikalien der Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Acros, Riedel-de Haen, ABX und TCI Europe NV in der Reinheit „zur Synthese“ oder besser und Lösungsmittel der Firmen Fluka, Thermo Fisher Scientific, Merck und Roth in der Reinheit HPLC-grade für HPLC-Untersuchungen. Alle sonstigen Lösungsmittel wurden in der Reinheit „puriss“ (oder vergleichbar) eingesetzt.

## **Material und Methoden**

Puffer / Lösungen	Chemikalien	Hersteller
Kryptofixlösung	KRYPTOFIX™ K2.2.2	Merck
	Kaliumcarbonat	Merck (z. A.
	Acetonitril	Fluka (absolut)
	Zusammensetzung: 92 mg K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 7 ml H <sub>2</sub> O, 500 mg K <sub>2.2.2</sub> in 43 ml MeCN	
PBS	300 mM Natriumchlorid	Aldrich
	5 mM Kaliumchlorid	Fluka
	16 mM Dinatriumhydrogenphosphat Decahydrat	Aldrich
	1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat	Aldrich
Phosphatpuffer nach Sörensen	Kaliumdihydrogenphosphat	Aldrich
	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Aldrich
	Lösung A: 9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen	
	Lösung B: 11,876 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen	
	Für den Puffer werden 81,8 ml Lösung B in einen 100-ml- Maßkolben pipettiert und mit der Lösung A bis zur Marke aufgefüllt. (Einstellung des pH-Wertes mit pH-Messgerät)	

### **6.1.3 Radionuklide**

Das Radionuklid <sup>124</sup>I wird als [<sup>124</sup>I]NaI-Lösung (50-300 MBq, 100-500 µl) in 0,1 M NaOH von der Firma QSA Global in Braunschweig geliefert. Die Aktivität der <sup>124</sup>I-markierten Substanzen werden mit dem Aktivimeter *ISOMED2000* durch Messungen im <sup>18</sup>F-Kanal bestimmt. Die Abweichung ist, wie vergleichende Messungen im <sup>124</sup>I-Kanal eines anderen Aktivimeters (*ISOMED2000*) zeigen, vernachlässigbar. Die Herstellung des <sup>124</sup>I erfolgt über die <sup>124</sup>Te(p,n)<sup>124</sup>I Reaktion am Zyklotron MGC-20<sup>14</sup> (Ritverc, Russland) mit einer Energie von 15 MeV bzw. über <sup>124</sup>Te(d,2n)<sup>124</sup>I am Zyklotron CV 28 (Universitätsklinikum Essen, Deutschland). Das von Ritverc hergestellte <sup>124</sup>I weist eine spezifische Aktivität von nicht weniger als 1400 GBq/µmol<sup>15</sup> auf.

<sup>14</sup> Persönliche Mitteilung des Ritverc-Supports, Herr A. Rogozev.

<sup>15</sup> Persönliche Mitteilung des Ritverc-Supports, Frau S.A. Simonova.

Das Radionuklid  $^{18}\text{F}$  wird über die  $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$  Reaktion am CYCLONE 18/9 Zyklotron (Ion Beam Application, Belgien) des Instituts für Radiopharmazie, FZD, hergestellt und liegt als  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$  in Wasser vor.

### 6.1.4 Zelllinien

Für die Bestimmung der Aufnahme der radiomarkierten Verbindungen und der zellzyklusinhibierenden Wirkung der Referenzsubstanzen werden die humanen Tumorzelllinien HT-29 (kolorektales Adenokarzinom) und FaDu (Plattenepithelkarzinom) eingesetzt (DSMZ, Braunschweig, Germany). Diese werden in McCoy's 5A Medium (HT-29) oder RPMI 1640 Medium (FaDu) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin-Streptomycin bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Feuchtigkeit in einem  $\text{CO}_2$ -Inkubator (Heracell, Heraeus, Hanau, Germany) inkubiert.

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion wurden je nach Trennproblem unterschiedliche Materialien eingesetzt. Für die  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ -Abtrennung vom Targetwasser finden Silika-basierende hydrophile Anionentauscher Accell Plus QMA Light der Firma Waters® Anwendung. Die Reinigung von organischen Verbindungen erfolgt mittels stark hydrophober Sep-Pak® Plus-C18-Kartuschen auf Silikagelbasis von Waters® oder durch Abtrennung mittels hochporösem Polystyrol-Divinylbenzol-Adsorberharz der Chromabond® HR-P Kartuschen von Macherey-Nagel. Vor den Anwendungen wurden die SepPak tC18 Plus Kartuschen und die Macherey-Nagel Chromabond® HR-P Kartuschen mit 10 ml Aceton und anschließend mit 10 ml dest. Wasser konditioniert. Die SepPak QMA Anionenaustauscher-Kartusche wurde zunächst mit 10 ml 1 M Natriumhydrogenkarbonatlösung und dann mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  konditioniert.

### 6.2.2 Massenspektrometer

Die Massenspektren niedermolekularer Substanzen wurden mit einem *Quattro Ultima* Massenspektrometer aufgenommen, welches im Elektrospray Ionisations-Modus (ESI) arbeitete. Alle Aufnahmen wurden im positiven Modus mit einem Cone von 10-30

aufgenommen. Für Messungen wurde ca. 1 mg der entsprechenden Substanzprobe in 1 ml MeOH oder Acetonitril gelöst, verdünnt (1:100) und mit einer Flussrate von 3 µl/min injiziert. Höhermolekulare Verbindungen (ab 400 g/mol) konnten auch mittels *Autoflex II TOF/TOF* MALDI-Massenspektrometer untersucht werden. Alle Aufnahmen wurden im positiven Modus mit dem Messprotokoll RP\_Pepmix (Bruker Daltonics®) erstellt. Die Auftragung der Proben auf das Target erfolgte im dried-droplet-Verfahren. Als Standard wurde ein von Peptidstandard (Bruker Daltonics®) eingesetzt.

Gerät:	Quattro-Ultima
Firma:	Micromass
Ionisierung:	Elektronenspray (ESI)

Gerät:	Autoflex II TOF/TOF
Firma:	Bruker Daltonics
Ionisierung:	MALDI(Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation)
Matrix:	alpha-Hydroxycyanozimtsäure

### 6.2.3 Dünnschichtchromatographie

#### **Reaktionskontrolle**

Zur Reaktionskontrolle werden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten (Normalphase oder Umkehrphase) mit Fluoreszenzindikator F<sub>254</sub> der Fa. Merck verwendet. Die Entwicklung erfolgt stets aufsteigend in einer gesättigten Kammer. Die Detektion erfolgt mittels UV-Lampe (254 nm), durch Anfärben mit Molybdätophosphorsäure-Lösung in Ethanol oder durch Bedampfen mit Iod in einer Iod-Kammer.

#### **Radiodünnschichtchromatographie**

Die radiochemische Ausbeute (RCA) wird mittels Radio-DC bestimmt. Sie wird definiert als der prozentuale Anteil der Fläche unter dem Produktpeak (Produktaktivität) zur Gesamtfläche unter der Kurve (Gesamtaktivität). Es werden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten mit Fluoreszenzindikator F<sub>254</sub> der Fa. Merck verwendet. Die Entwicklung erfolgte stets aufsteigend in einer gesättigten Kammer. Die Auswertung der Dünnschichtplatte erfolgt mit dem BAS 2000 Scanner (FUJI). Dafür wird die DC-Platte nach der Entwicklung auf eine Image-Platte mit strahlungsempfindlicher Schicht aus Kristallen (Bariumfluorobromid mit Europium dotiert) gelegt. Die radioaktive

Strahlung der aufgetragenen Probe regt die Elektronen der Image-Platte an. Das entstehende Energieprofil kann anschließend im Scanner ausgelesen werden. Dabei werden die Elektronen mit einem Laser angeregt, fallen dann in ihren Grundzustand zurück und emittieren Energie in Form von Licht. Dieses Licht wird durch Lichtleitsysteme registriert und in ein Bild umgewandelt. Mit dem Programm TINA 2.09e ist es möglich die erhaltenen Daten über Radiodünnschichtchromatogramme quantitativ auszuwerten.

### 6.2.4 Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte werden mit einem Heiztischmikroskop Galen III der Fa. CAMBRIDGE INSTRUMENTS gemessen und sind unkorrigiert.

### 6.2.5 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Aufnahmen erfolgten mit dem Gerät VARIAN, UNITY INOVA 400.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren werden bei 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden entkoppelt bei 100 MHz und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren bei 376 MHz aufgenommen. Es wurden deuterierte Lösungsmittel entsprechend den Angaben der ausgewerteten Spektren verwendet. Als Referenz für die Justierung der Verschiebung  $\delta$  wurde der vom Lösungsmittel erzeugte Peak verwendet.  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren sind unjustiert angegeben, da kein entsprechender Standard zugesetzt wurde.

$\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 7,26$  im  $^1\text{H}$ -NMR (s),  $77,0$  im  $^{13}\text{C}$ -NMR

$\text{DMSO}-d_6$ :  $\delta = 2,50$  im  $^1\text{H}$ -NMR (quint.),  $39,3$  im  $^{13}\text{C}$ -NMR

Aceton- $d_6$ :  $\delta = 2,05$  im  $^1\text{H}$ -NMR (sept.),  $30,83$  im  $^{13}\text{C}$ -NMR

Bei den Zuordnungen der chemischen Verschiebungen in den NMR-Spektren wurden folgende Abkürzungen benutzt:

- H bzw. C: entsprechendes Atom bei einfachen Verbindungen
- Boc-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>: Protonen der *tert*-Butylgruppe der Boc-Schutzgruppe
- Piperazin-CH<sub>2</sub>: Protonen/Kohlenstoffatome des Piperazins der Seitenkette
- Phenyl-CH: Protonen/Kohlenstoffatome des Phenylrings der Seitenkette
- Cyclopentyl-CH/-CH<sub>2</sub>: Protonen/Kohlenstoffatome des Cyclopentylrings

Die Aufspaltung der Signale in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurde mit den üblichen Abkürzungen angegeben: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), quint. (Quintuplett), sept. (Septett), m (Multiplet).

### **6.2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Die chromatographische Trennung erfolgte über verschiedene Chromatographiesäulen und Elutionssysteme. Als Eluenten wurden in allen Systemen H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) (A) und Acetonitril (0,1% TFA) (B) verwendet.

#### **Analytik der <sup>124</sup>I-markierten Verbindungen**

Analytisches HPLC-System, Chromatographiesäule CIII  
Gradient GI (Fluss 1 ml/min)

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	60	40
7	60	40
12	20	80
16	20	80

Gradient GII (Fluss 1ml/min):

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	70	30
5	70	30
10	20	80
12	20	80

#### **Analytik der <sup>18</sup>F-markierten Verbindungen**

Analytisches HPLC-System, Chromatographiesäule CI  
Gradient GIII (Fluss: 1 ml/min):

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	65	35
10	50	50
14	50	50

Analytisches HPLC-System, Chromatographiesäule CIII  
Isokratisch I (Fluss: 1 ml/min):

A [%]	B [%]
72	28

#### **Reinigung der <sup>124</sup>I-markierten Verbindungen**

Semipräparatives HPLC-System sII, Chromatographiesäule CIV  
Gradient GIV (Fluss 1,5 ml/min bzw. 3 ml/min):

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	60	40
7	60	40
12	20	80
16	20	80



### Reinigung der <sup>18</sup>F-markierten Verbindungen

Semipräparatives HPLC-System sl, Chromatographiesäule CII  
Isokratisch II (Fluss: 2 ml/min):

A [%]	B [%]
65	35

#### 6.2.7 Flash-Chromatographie

Die Flash-Chromatographie [203] wird mit Kieselgel (230-400 mesh) der Fa. MERCK als stationäre Phase durchgeführt. Die angegebenen Laufmittelzusammensetzungen stellen Volumenverhältnisse dar.

#### 6.2.8 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität ( $A_S$ ) der für die radiopharmakologische Evaluation vorgesehenen Verbindungen [<sup>124</sup>I]CKIA, [<sup>124</sup>I]CKIB und [<sup>18</sup>F]CKIE erfolgt mittels analytischer HPLC. Mit einer Verdünnungsreihe der Referenzverbindung wird eine Kalibriergerade aufgenommen. Die Fläche unter dem Peak der Referenz wird in Abhängigkeit zur Stoffmenge der einzelnen Lösungen gesetzt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wird das radioaktive Produkt mittels HPLC analysiert. Die injizierte Aktivität wird durch Ausmessen der Spritze vor ( $A_V$ ) und nach ( $A_N$ ) der Injektion bestimmt. Anhand der Integrationsfläche des UV-aktiven Signals kann dann die Gesamtstoffmenge ( $n_P$ ) enthaltener nicht radioaktiver und radioaktiver Produktsubstanz bestimmt werden.

$$A_S = \frac{A_V - A_N}{n_P} \left[ \frac{GBq}{\mu mol} \right]$$

**Gleichung 1:** Berechnung der spezifischen Aktivität ( $A_S$ )

Injektionsvolumen: 10 µl

Verdünnungsreihe **CKIA:** 0,1-20 µg/ml

**CKIB:** 0,2-8 µg/ml

**CKIE:** 0,2-10 µg/ml

Kalibriergeraden (mit Regressionsfaktoren):

$$\text{CKIA: } m_{CKIA}(F_{CKIA}) = 2 \cdot 10^{-7} \cdot F_{CKIA} + 0,0004 \quad R^2 = 0,9989$$

$$\text{CKIB: } m_{CKIB}(F_{CKIB}) = 2 \cdot 10^{-7} \cdot F_{CKIB} - 0,0013 \quad R^2 = 0,9967$$

$$\text{CKIE: } m_{CKIE}(F_{CKIE}) = 2 \cdot 10^{-7} \cdot F_{CKIE} - 0,0034 \quad R^2 = 0,9995$$

### 6.2.9 Bestimmung der Lipophilie

Die Bestimmung der Lipophilie bei einem pH-Wert von 7,4 ( $\log D_{7,4}$ ) erfolgt über den Verteilungskoeffizienten der Verbindung in einem Zweiphasensystem aus 1-Oktanol und 10 mM Sörensen-Phosphatpuffer (pH = 7,4) nach einer Methode von Wilson *et al.* [191]. Dreimal 600 µl Sörensen-Phosphatpuffer und 600 µl 1-Oktanol werden zusammen mit ca. 500 KBq der zu untersuchenden Verbindung in ein *low-bind* Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Die Gemische werden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend zentrifugiert man 10 min zur vollständigen Phasentrennung. Zur Messung der Radioaktivität in den beiden Phasen werden dreimal 100 bzw. 200 µl der wässrigen Phase und dreimal 10 µl der organischen Phase entnommen und die  $^{18}\text{F}/^{124}\text{I}$  Gammaenergie mit Hilfe des Cobra™ II Auto-Gamma-Zählers bestimmt. Das Volumen der organischen Phase wird vor der Messung mit 1-Oktanol auf das Volumen der wässrigen Phase aufgefüllt. Die Berechnung des  $\log P$ -Wertes erfolgt anhand folgender Gleichung:

$$\log D_{7,4} = \log \left( \frac{A_{\text{org.P.}}}{A_{\text{wäss.P.}}} \right)$$

$A_{\text{org.P.}}$  ...prozentualer Anteil der Fläche unter dem  
Peak der organischen Phase (Aktivität der  
organischen Phase) zur Gesamtfläche unter  
der Kurve (Gesamtaktivität).

**Gleichung 2:** Berechnung des  $\log D_{7,4}$ -Wertes

$A_{\text{wäss.P.}}$  ...prozentualer Anteil der Fläche unter dem  
Peak der wässrigen Phase (Aktivität der  
wässrigen Phase) zur Gesamtfläche unter  
der Kurve (Gesamtaktivität).

Für jede Verbindung werden jeweils zwei unabhängige Bestimmungen mit neun Einzelwerten für jede Phase durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

### 6.2.10 Stabilitätsstudien<sup>16</sup>

Die *in vitro*- und *ex vivo*-Stabilitätsuntersuchungen der radiomarkierten Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA, [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE erfolgen mittels HPLC-Analyse. Ein Aliquot der radiomarkierten Verbindung (50 kBq) wird zu 1 ml PBS, Ethanol, Zellkulturmedium (RPMI + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin) oder frischen Rattenplasma gegeben und für 30 min, 1 h bzw. 24 h bei 37°C inkubiert. Die HPLC Analyse erfolgt mittels

---

<sup>16</sup> Die Stabilitätsuntersuchungen wurden freundlicherweise von Frau A. Suhr durchgeführt

Hewlett Packard Series 1100 (Detektor: Raytest Ramona) mit einer Zorbax 300SB-C18 Chromatographiesäule (250 × 9.4 mm, 5 µm) unter Gradientenelution mit Sörensen-Phosphatpuffer (0.01 M, pH 7.4) und Methanol (in 5 min von 40 zu 90% Methanol, dann 25 min 90% Methanol). Um die Stabilität *in vivo* zu untersuchen, werden die Verbindungen [<sup>124</sup>I]CKIA, [<sup>124</sup>I]CKIB und [<sup>18</sup>F]CKIE über die Schwanzvene in Wistar-Ratten injiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten werden Blutproben entnommen, zentrifugiert und mittels HPLC untersucht.

### 6.2.11 Bioverteilungsuntersuchungen<sup>17</sup>

Die Bioverteilung der radiomarkierten Verbindungen [<sup>124</sup>I]CKIA und [<sup>124</sup>I]CKIB werden in 5-6 Wochen alten normalen männlichen Wistar-Ratten bestimmt. Ein Aliquot der radiomarkierten Verbindung (0,5 MBq) wird in 500 µl E153 Infusionslösung, versetzt mit 1% humanem Serumalbumin (HSA) aufgenommen. Nach intravenöser Applikation über die Schwanzvene werden die Tiere zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (5 min, 60 min) mit Diethylether narkotisiert und durch Blutentnahme mittels Herzpunktion getötet. Anschließend werden den Versuchstieren Organe und Gewebeproben entnommen. Diese werden gewogen und ihr Aktivitätsgehalt in einem Gammastrahlenmessgerät quantifiziert. Die gemessenen Aktivitätswerte werden zur der eingesetzten Aktivitätsmenge normalisiert und in standardisierte Aufnahmewerte (SUV) umgerechnet. Die Umrechnung erfolgt nach der Gleichung 3:

$$SUV = \frac{\text{Aktivitätsmenge im Organ} / \text{Organgewicht}}{\text{gesamte injizierte Aktivitätsmenge} / \text{Gesamtgewicht}}$$

**Gleichung 3:** Berechnung des Standard Uptake Values (SUV)

Die Aktivitätsmenge im Urin wird aus der gesamten injizierten Aktivität minus der Summe der Aktivitätsmengen in den einzelnen Organen und dem Resttier berechnet.

### 6.2.12 Zellaufnahmestudien<sup>18</sup>

Für die Untersuchung der Aufnahme der radiomarkierten Verbindungen [<sup>124</sup>I]CKIA, [<sup>124</sup>I]CKIB und [<sup>18</sup>F]CKIE werden 5×10<sup>4</sup> Zellen der Zelllinien FaDu und HT-29 in die Vertiefungen einer 24 Well Platte (Greiner, Frickenhausen, Germany) ausgesät. Nach

---

<sup>17</sup> Die Bioverteilungsuntersuchungen wurden freundlicherweise von Frau R. Herrlich durchgeführt.

<sup>18</sup> Die Zellaufnahmestudien wurden freundlicherweise von Frau DC F. Graf durchgeführt.

der Inkubation über Nacht werden 0,25 ml Zellkulturmedium mit ca. 25 kBq [ $^{124}$ I]CKIA, oder [ $^{124}$ I]CKIB bzw. 250kBq [ $^{18}$ F]CKIE zugegeben. Die Platten werden bei 37 °C entsprechend der Untersuchungszeiträume inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 0,5 ml 0,1 M Natriumhydroxid mit 1% SDS lysiert. Die Zelllysate werden am Cobra II gamma counter (Canberra-Packard, Meriden, CT, USA) ausgemessen. Die Proteinbestimmung erfolgt mittels BCA Protein-Assay-Kit (Pierce, Rockford, USA) nach der Herstelleranleitung und mit Rinder-Serumalbumin als Proteinstandard. Die bestimmten Aufnahmen sind als Prozent der injizierten Dosis pro mg Protein (%ID/mg protein) angegeben.

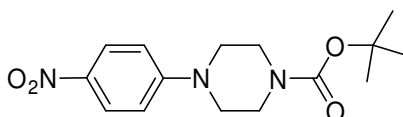
### 6.2.13 Zellzyklusanalyse<sup>19</sup>

Die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzykluses wird mittels Durchflusszytometrie am FACSCalibur™ Flow Cytometer (Becton Dickinson, Zürich, Schweiz) mit der Software CellQuest Pro bestimmt. Nach der Inkubation von  $1 \times 10^6$  cells für 24 h mit/ohne der Referenzsubstanzen **CKIA-E** werden die Zellen in 70%igem Ethanol fixiert und mit 1 µg/mL Ribonuclease I (Sigma-Aldrich) behandelt und anschließend mit 10 µg/mL Propidiumiodid (Sigma-Aldrich) im Dunkeln gefärbt. Für die Zellzyklusanalyse werden ca. 20000 Zellen mit einer Rate von weniger als 300 Zellen/s gemessen. Die Datenauswertung erfolgt mittels ModFit LT Software.

## 6.3 Organische Synthesen

Bei bereits in der Literatur bekannten Verbindungen erfolgt eine Charakterisierung durch Vergleich mit den in der Literatur angegebenen  $^1\text{H}$ -NMR-Daten. Bei Übereinstimmung der Angaben wird dies im Folgenden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 6.3.1 Synthese von *tert*-Butyl-4-(4-nitrophenyl)piperazin-1-carboxylat (1)



Die Synthese erfolgt nach VanderWel *et al.*, 2005 [13]. 3,00 g 1-Fluor-4-nitrobenzen (1,00 äq., 20,05 mmol), 4 ml Diisopropylethylamin (1,10 äq., 22,05 mmol) und 4,10 g

---

<sup>19</sup> Die Zellzyklusanalysen wurden freundlicherweise von Frau F. Graf durchgeführt.

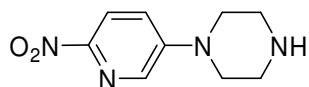
1-Boc-Piperazin (1,10 äq., 22,05 mmol) in 20 ml MeCN lösen und für 12 h unter Rückfluss erhitzen. Das Reaktionsgemisch wird mit 170 ml Wasser verdünnt und der entstandene Feststoff abfiltriert. Die wässrige Lösung wird mit 20 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit 20 ml Wasser und 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält **1** als orangenen Feststoff. Die Verbindung wurde ohne weitere Aufarbeitung für weitere Synthesen eingesetzt.

**Ausbeute:** 1,75 g (35%)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO):**  $\delta$  8,07 (d,  $^3J = 9,5$  Hz, 2H, Phenyl-CH), 7,01 (d,  $^3J = 9,5$  Hz, 2H, Phenyl-CH), 3,44-3,50 (m, 8H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 1,42 (s, 9H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)\*

**MS (ESI positiv):**  $m/z = 308,16$  [M+H]<sup>+</sup>, 251,24 [M-(Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)+H]<sup>+</sup>, 207,23 [M-Boc+H]<sup>+</sup>

### 6.3.2 Synthese von 1-(6-Nitropyridin-3-yl)piperazin (**2**)

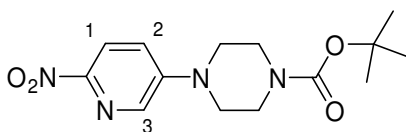


Die Synthese erfolgt nach Toogood *et al.*, 2005 (*supporting information*) [12]. 5,30 g 5-Brom-2-nitropyridin (1,00 äq., 2,0 mmol), 0,62 g Tetrabutylammoniumiodid (0,05 äq., 1,7 mmol) 3,76 g Piperazin (1,30 äq., 44,0 mmol) und 5,11 g Kaliumcarbonat (1,10 äq., 37,0 mmol) in DMSO lösen und für 12 h unter Rühren auf 80 °C erhitzen. Das Reaktionsgemisch wird mit 170 ml Wasser verdünnt und der entstandene Feststoff abfiltriert. Die wässrige Lösung wird mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit 20 ml Wasser und 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält **2** als orangenen Feststoff. Die Verbindung wurde ohne weitere Aufarbeitung für weitere Synthese eingesetzt.

**Ausbeute:** 9,98 g (95%)

**MS (ESI positiv):**  $m/z = 209,22$  [M+H]<sup>+</sup>

### 6.3.3 Synthese von *tert*-Butyl-4-(6-nitropyridin-3-yl)piperazine-1-carboxylat (**3**)



#### Variante A:

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Toogood *et al.*, 2005 (*supporting information*) [12]. 6,75 g **2** (1,00 äq., 32,4 mmol) wird in 50 ml THF gelöst und anschließend mit 3,00 g Natriumhydrogencarbonat (1,05 äq., 34,0 mmol) in 12,5 ml Wasser versetzt. Dann werden 4,50 g Di-*tert*-butyl-dicarbonat (0,90 äq., 30 mmol) so zugegeben, dass die Temperatur der Reaktionslösung nicht über 26 °C steigt. Das Reaktionsgemisch wird für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 30 ml Wasser aufgenommen. Das Produkt wird mit drei mal 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man erhält einen braunen Feststoff, der in 60 °C heißem Ethylacetat gelöst wird. Die Lösung wird filtriert und das Filtrat im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Man erhält **3** als orangen Feststoff.

**Ausbeute:** 4,00 g (40%)

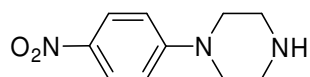
#### Variante B:

Die Synthese erfolgt nach VanderWel *et al.*, 2005 [13]. 4,20 g 2-Brom-5-nitropyridin (1,00 äq., 20,05 mmol), 4 ml Diisopropylethylamin (1,10 äq., 22,05 mmol) und 4,00 g 1-Boc-Piperazin (1,10 äq., 21,48 mmol) in 20 ml MeCN lösen und für 12 h unter Rückfluss erhitzen. Das Reaktionsgemisch wird mit 170 ml Wasser verdünnt und der entstandene Feststoff abfiltriert. Die wässrige Lösung wird mit 20 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit 20 ml Wasser und 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel im Vakuum entfernen. Man erhält **3** als orangenen Feststoff. Die Verbindung wurde ohne weitere Aufarbeitung für weitere Synthese eingesetzt.

**Ausbeute:** 2,35 g (35%)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,18 (d, <sup>4</sup>J = 3,0 Hz, 1H, 3-H), 8,12 (d, <sup>3</sup>J = 9,1 Hz, 1H, 1-H), 7,21 (dd, <sup>4</sup>J = 3,0 Hz, <sup>3</sup>J = 9,1 Hz, 1H, 2-H), 3,63-3,65 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,44-3,46 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 1,49 (s, 9H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)\*

#### 6.3.4 Synthese von 1-(4-Nitrophenyl)piperazin (**4**)



Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von VanderWel et al., 2005 [13]. 10,0 g 1-Fluornitropyridin (1,00 äq., 71,0 mmol), 13,3 ml Diisopropylamin (1,10 äq., 78 mmol) und 14,1 g Piperazin (2,30 äq., 164 mmol) in 160 ml MeCN lösen und für 16 h unter Rückfluss erhitzen. Nach dem Abkühlen wird der entstandene Feststoff abfiltriert, mit Acetonitril gewaschen und das verbleibende Piperazin im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Chloroform umkristallisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt konnte mittels Säulenchromatographie (Chloroform/Methanol 19:1 → 3:1) gereinigt werden. Man erhält **4** als orangenen Feststoff.

**Ausbeute:** 11,6 g (79%)

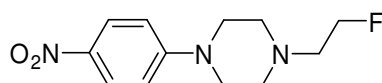
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,07 (d, <sup>3</sup>J = 9,3 Hz, 2H, Phenyl-CH), 6,99 (d, <sup>3</sup>J = 9,5 Hz, 2H, Phenyl-CH), 3,41-3,44 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,85-2,89 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>)

**MS (ESI positiv):** m/z = 208,24 [M+H]<sup>+</sup>

#### 6.3.5 Fluorierung der Seitenkette

Die Synthese erfolgte nach Abwandlung einer Vorschrift von Piel et al., 2003 [164]. 2,98 g Kaliumcarbonat (3,00 äq., 21,6 mmol) und 0,93 g (1,00 äq., 7,2 mmol) 1-Fluor-2-Bromethan werden in 10 ml Dioxan gelöst. **2** oder **4** (1,00 äq., 7,2 mmol) und eine Spatelspitze Natriumiodid werden unter Rühren zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit 10 ml dest. Wasser und 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt und das Reaktionsprodukt mittels säulenchromatographischer Trennung gereinigt (10% MeOH in Dichlormethan).

#### Synthese von 1-(2-Fluorethyl)-4-(4-nitrophenyl)piperazin (**5**)



Ausgehend von 1,50 g **4** (1,00 äq., 7,2 mmol) erhält man **5** als gelbbraunen Feststoff.

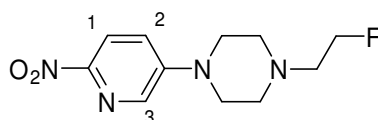
**Ausbeute:** 1,04 g (54%)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO):** δ 8,06 (d, <sup>3</sup>J = 9,4 Hz, 2H, Phenyl-CH), 6,76 (d, <sup>3</sup>J = 9,5 Hz, 2H, Phenyl-CH), 4,48-4,68 (m, 2H F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,38-3,48 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,62-2,78 (m, 6H, Piperazin-CH<sub>2</sub>, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)

**<sup>19</sup>F-NMR (DMSO):** δ -218,43 (m)

**MS (ESI positiv):** m/z = 254,13 [M+H]<sup>+</sup>

### Synthese von 1-(2-Fluorethyl)-4-(6-nitropyridin-3-yl)piperazin (6)



Ausgehend von 1,50 g **2** (1,00 äq., 7,2 mmol) erhält man **6** als gelbbraunen Feststoff.

**Ausbeute:** 0,95 g (52%)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,23 (d, <sup>4</sup>J = 3,0 Hz, 1H, 3-H), 8,12 (d, <sup>3</sup>J = 9,2 Hz, 1H, 1-H), 7,44-7,46 (m, 1H, 2-H), 4,56 (dt, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 4,8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,F</sub> = 47,8 Hz, 2H, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,47 (t, <sup>3</sup>J = 4,9 Hz, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,66 (dt, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 4,8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,F</sub> = 28,9 Hz, 2H, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2,57-2,59 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>),

**<sup>19</sup>F-NMR (DMSO):** δ -218,54 (m)

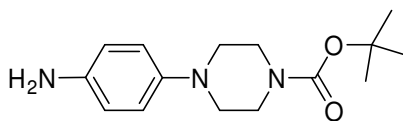
**MS (ESI positiv):** m/z = 277,14 [M+Na]<sup>+</sup>

### 6.3.6 Reduktion der Seitenketten

630,0 mg Ammoniumformiat (5,00 äq., 10,0 mmol) werden für 24 h im Exsikkator getrocknet. **1**, **3**, **5** oder **6** (1,00 äq., 2,0 mmol) werden in 5 ml Methanol gelöst. Im Anschluss an die Zugabe des Ammoniumformiats wird das Reaktionsgemisch auf dem Eisbad gekühlt. 1 mg Palladium auf Aktivkohle (0,50 äq., 1,0 mmol) wird langsam dazugegeben, dabei verfärbt sich die Lösung gelbgrün und erhitzt sich stark. Anschließend wird das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird über einen doppelten Filter filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und mit dreimal 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



### Synthese von *tert*-Butyl-4-(4-aminophenyl)piperazin-1-carboxylat (**7**)



Ausgehend von 614,7 mg **1** (1,00 äq., 2,0 mmol) erhält man **7** als schwarzvioletten Feststoff.

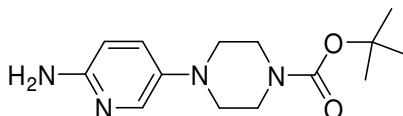
**Ausbeute:** 467,2 mg (84%)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 6,80-6,82 (m, 2H, Benzyl-CH), 6,63-6,65 (m, 2H, Benzyl-CH), 3,52-3,58 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,94-3,00 (m, 4H, Piperazin-CH), 1,42 (s, 9H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)\*

**MS (ESI positiv):** m/z = 300,15 [M+Na]<sup>+</sup>, 278,14 [M+H]<sup>+</sup>, 222,05 [M-(Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)+H]<sup>+</sup>, 178,01 [M-Boc+H]<sup>+</sup>

**Smtp.:** 126,3-129,2 °C\*

### Synthese von *tert*-Butyl-4-(6-aminopyridin-3-yl)piperazin-1-carboxylat (**8**)



Ausgehend von 616,5 mg **3** (1,00 äq., 2,0 mmol) erhält man **8** als schwarzvioletten Feststoff.

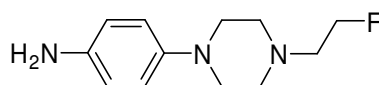
**Ausbeute:** 530,8 mg (96%)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 7,60-7,64 (m, 1H, Pyridin-CH), 7,14-7,21 (m, 1H, Pyridin-CH), 6,39-6,43 (m, 1H, Pyridin-CH), 3,42-3,48 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,84-2,90 (m, 4H, Piperazin-CH), 1,42 (s, 9H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)\*

**MS (ESI positiv):** m/z = 301,19 [M+Na]<sup>+</sup>, 279,18 [M+H]<sup>+</sup>, 223,08 [M-(Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)+H]<sup>+</sup>, 179,04 [M-Boc+H]<sup>+</sup>

**Smtp.:** 124,7-129,3 °C\*

### Synthese von 4-(4-(2-Fluorethyl)piperazin-1-yl)anilin (**9**)

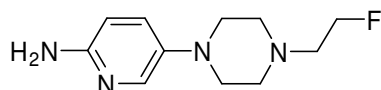


Ausgehend von 506,5 mg **5** (1,00 äq., 2,0 mmol) erhält man **9** als schwarzbraunes Öl.

**Ausbeute:** 372,1 mg (83%)

**MS (ESI positiv):**  $m/z = 246,14 [M+Na]^+$ ,  $224,14 [M+H]^+$

### Synthese von 5-(4-(2-Fluorethyl)piperazin-1-yl)pyridin-2-amin (10)

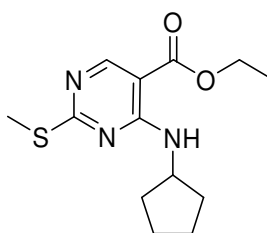


Ausgehend von 508,5 mg **6** (1,00 äq., 2,0 mmol) erhält man **10** als schwarzbraunes Öl.

**Ausbeute:** 188,1 mg (42%)

**MS (ESI positiv):**  $m/z = 225,14 [M+H]^+$

### 6.3.7 Synthese von 4-Cyclopentylamin-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-carbonsäure-ethylester (11)



Die Synthese erfolgt in Analogie zu VanderWel *et al.*, 2005 [13]. Zu einer Lösung von 25,00 g 4-Chloro-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-carbonsäure-ethylester (1,00 äq., 107,4 mmol) in 400 ml trockenem THF werden 32,60 g Triethylamin (3,00 äq., 322,5 mmol) und 27,46 g Cyclopentylamin (3,00 äq., 322,5 mmol) gegeben. Der Reaktionsansatz wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss werden die entstandenen Salze abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und mit 100 ml 0.1 M Natronlauge gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Man erhält **11** als oranges Öl.

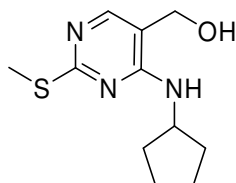
**Ausbeute:** 27,88 g (93%)

**Rf-Wert:** 0,83 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  8,56 (s, 1H, N=CH), 8,24 (br s, 1H, NH), 4,43 (m, 1H, Cyclopentyl-CH), 4,26 (quart.,  $^3J = 7,2$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,48 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 1,99-2,07 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,45-1,74 (m, 6H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,32 (t,  $^3J = 7,1$  Hz, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)\*

**MS (ESI positiv):**  $m/z = 282,16 [M+H]^+$

### 6.3.8 Synthese von 4-Cyclopentylamin-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl methanol (**12**)



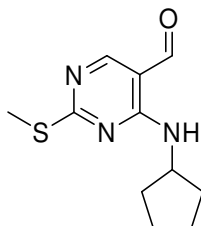
Die Synthese erfolgt in Analogie zu VanderWel et al., 2005 [13]. 100 ml 1 M Lithiumaluminiumhydridsuspension (1,88 äq., 100,0 mmol) in THF werden unter Schutzgas (Argon) in einem ausgeheizten Zweihalskolben vorgelegt und mittels Eisbad gekühlt. 15,00 g **11** (1,00 äq., 53,3 mmol) werden in 200 ml trockenem THF gelöst und mittels Tropftrichter tropfenweise zugegeben. Die Reaktionstemperatur wird stets unter 10°C gehalten. Im Anschluss wird das Eisbad entfernt und die Reaktion für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch langsame Zugabe von 30 ml 1,0 M Natronlauge gestoppt. Die entstandenen weißen Salze werden über einer Fritte abgetrennt und mit wenig THF gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt. Um das Produkt auszukristallisieren wird der Rückstand (ca. 5 ml) mit 250 ml Petrolether versetzt. Man erhält **12** als hellgelbe Kristalle.

**Ausbeute:** 9,3 g (73%)

**Rf-Wert:** 0,15 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  7,58 (s, 1H, N=CH), 5,89-5,94 (m, 1H, OH), 4,37-4,45 (m, 3H, CH<sub>2</sub>OH, Cyclopentyl-CH), 2,48 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2,01-2,10 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,58-1,77 (m, 4H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,42-1,51 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)\*

### 6.3.9 Synthese von 4-Cyclopentylamino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl carbaldehyd (**13**)



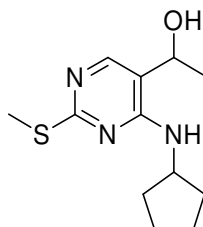
Die Synthese erfolgt in Analogie zu VanderWel et al., 2005 [13]. 9,00 g **12** (1,00 äq., 37,8 mmol) werden in Chloroform gelöst und mit 32,80 g aktivierten Braunstein (10,00 äq., 370,0 mmol) versetzt. Die Suspension wird für min. 4 h bei Raumtemperatur gerührt und der Umsatz der Reaktion mittels DC kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz werden die festen Bestandteile über Celite als Filtrierhilfsmittel mit einer Fritte abgetrennt. Der Filterkuchen wird mit 100 ml Chloroform gewaschen und anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Ethylacetat aufgenommen und säulenchromatographisch (Ethylacetat/Petrolether 1:1) gereinigt. Man erhält **13** als hellgelbes Öl.

**Ausbeute:** 9,30 g (73%)

**Rf-Wert:** 0,44 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 9,61 (s, 1H, HC=O), 8,53 (br s, 1H, NH), 8,23 (s, 1H, N=CH), 4,47 (m, 1H, Cyclopentyl-CH), 2,51 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>) 2,01-2,07 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,47-1,76 (m, 6H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)\*

### 6.3.10 Synthese von 1-(4-Cyclopentylamino-2-methylsulfonyl-pyrimidin-5-yl)-ethanol (**14**)



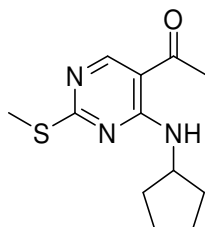
Die Synthese erfolgt in Analogie zu VanderWel et al., 2005 [13]. 8,7 g **13** (1,00 äq., 36,7 mmol) werden unter Schutzgas in THF gelöst und mittels Eisbad gekühlt. 36,7 ml Methylmagnesiumbromid (3,00 äq., 11,0 mmol) werden mit einer Spritze langsam zugegeben und anschließend 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird mit 100 ml eiskalter gesättigter Ammoniumchloridlösung gequencht und dann mit wenig Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 20 ml Natriumchloridlösung gereinigt und im Anschluss über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man erhält **14** als farbloses Öl. **14** wird ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion eingesetzt.

**Ausbeute:** 8,67 g (93%)

**Rf-Wert:** 0,21 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**MS (ESI positiv):**  $m/z = 276,11 [M+Na]^+$ ,  $254,13 [M+H]^+$

### 6.3.11 Synthese von 1-(4-Cyclopentylamino-2-methylsulfanyl-pyrimidin-5-yl)-ethanon (**15**)



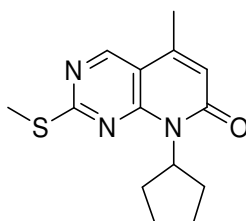
8,67 g **14** (1,00 äq., 34,2 mmol) werden in 200 ml Chloroform gelöst und mit 39,0 g aktivierten Braunstein (13,00 äq., 445,0 mmol) versetzt. Die Suspension wird für min. 4 h bei Raumtemperatur gerührt und der Umsatz der Reaktion mittels DC kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz werden die festen Bestandteile über Celite als Filtrierhilfsmittel abgefrittet. Der Filterkuchen wird mit 100 ml Chloroform gewaschen und anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Ethylacetat aufgenommen und säulenchromatographisch (Ethylacetat/Petrolether 3:7) gereinigt. Man erhält **15** als hellgelben Feststoff.

**Ausbeute:** 7,06 g (82%)

**Rf-Wert:** 0,43 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9,28 (br s, 1H, NH), 8,52 (s, 1H, N=CH), 4,49 (m, 1H, Cyclopentyl-CH), 2,54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,03-2,12 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,51-1,83 (m, 6H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)\*

### 6.3.12 Synthese von 8-Cyclopentyl-5-methyl-2-methylsulfanyl-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-on (**16**)



Die Synthese erfolgte ähnlich einer Vorschrift von Gester et al. [128]. 2,46 g Kalium-*tert*-butylat (2,60 äq., 21,9 mmol) werden in einem ausgeglühten Zweihalskolben unter Argon in DMF suspendiert und mittels Eisbad gekühlt. 2,14 g **15** (1,00 äq., 8,5 mmol) und 4,00 ml Triethylphosphonoacetat (2,60 äq., 21,9 mmol) werden in DMF gemischt

und langsam zugegeben. Das Eisbad wird entfernt und das Reaktionsgemisch für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abkühlen mittels Eisbad mit gesättigter Natriumchloridlösung versetzt, mit wenig konzentrierter Salzsäure neutralisiert und mit dreimal 20 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in eiskaltem Ethylacetat aufgenommen. Der Niederschlag wird abgefrittet und in warmen Dichlormethan gelöst. Der verbleibende Feststoff wird mit warmen Dichlormethan gespült. Das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt. Man erhält **16** als hellgelben Feststoff.

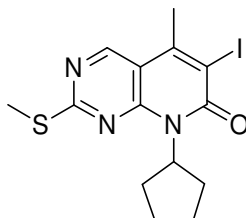
**Ausbeute:** 1,99 g (85%)

**Rf-Wert:** 0,35 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,69 (s, 1H, N=CH), 6,44 (s, 1H, C=CH), 5,91 (quint., <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 2,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,28-2,37 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 2,01-2,12 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,83-1,92 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,63-1,75 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)\*

**MS (ESI positiv):** m/z = 298,07 [M+Na]<sup>+</sup>, 276,13 [M+H]<sup>+</sup>

### 6.3.13 Synthese von 8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-methylsulfanyl-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-on (**17**)



Die Synthese erfolgt in Analogie zu VanderWel et al., 2005 [13]. 1,78 g Bis(trifluoroacetoxy)iodbenzol (1,20 äq., 4,0 mmol) und 962,0 mg Iod (1,10 äq., 3,7 mmol) werden in einem Rundkolben in 20 ml Dichlormethan gelöst. Der Rundkolben wird mit Alufolie lichtgeschützt verpackt und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 910,0 mg **16** (1,00 äq., 3,3 mmol) in einer Portion zugegeben und die dunkelviolette Lösung für 2 h unter Rückfluss auf 40°C erhitzt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 10 ml 50% Natriumthiosulfatlösung für 30 min gerührt, dabei verfärbt sich die Lösung von dunkelviolett nach hellgelb. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit zweimal 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum

eingeeengt. Der Rückstand wird in wenig Ethylacetat/Petrolether (3:7) aufgenommen und säulenchromatographisch (Ethylacetat/Petrolether 3:7) gereinigt. Man erhält **17** als weißen Feststoff.

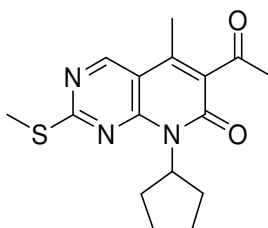
**Ausbeute:** 411,0 mg (31%)

**Rf-Wert:** 0,75 (Ethylacetat/Petrolether 3:7)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,80 (s, 1H, N=CH), 6,05 (quint., <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 2,70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,22-2,33 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 2,04-2,15 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,82-1,92 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,62-1,72 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)\*

**MS (ESI positiv):** m/z = 402,01 [M+H]<sup>+</sup>

### 6.3.14 Synthese von 6-Acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-methylsulfanyl-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-on (**18**)



Die Synthese erfolgte ähnlich der Darstellung in [158]. 100,0 mg **17** (1,00 äq., 0,25 mmol), 137,3 mg Tributylethoxyvinylstannan (1,50 äq., 0,38 mmol) und 1,5 mg (PhCN)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub> werden unter Stickstoffatmosphäre in 5 ml trockenen DMSO gelöst und für mindestens 24 h auf 70 °C erhitzt. Die Reaktion ist beendet, wenn mittels DC keine Spot der Verbindung **17** detektiert werden kann. Das Reaktionsgemisch wird in 20 ml 6 M HCl aufgenommen und für 1 h gerührt. Nach Zugabe von 20 ml Ethylacetat kann die organische Phase abgenommen werden. Die organische Phase wird mit 20 ml gesättigter KF-Lösung versetzt und für 30 min gerührt. Der entstehende Niederschlag wird über eine Fritte mit Celite als Filtrierhilfsmittel abgetrennt. Die organische Phase wird abgenommen und mit zweimal 20 ml dest. Wasser gewaschen, die wässrige Phase wird mit zweimal 20 ml Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann mittels säulenchromatographischer Trennung (Ethylacetat/Petrolether 1:4) gereinigt werden. Man erhält **18** als hellbeigen Feststoff.

**Ausbeute:** 58,0 mg (73%)

**Rf-Wert:** 0,50 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

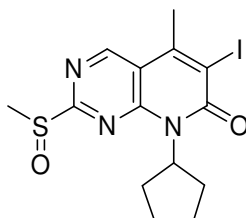
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,78 (s, 1H, N=CH), 5,91 (quint., <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 2,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,26-2,37 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,99-2,11 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,82-1,92 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,63-1,73 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)

**MS (ESI positiv):** m/z = 318,19 [M+H]<sup>+</sup>

### 6.3.15 Oxidation zum Sulfoxid mit dem Oxaziridin 27

Die Synthese erfolgt in Analogie zu VanderWel et al., 2005 [13]. **17** oder **18** (1,00 äq.) und 2-Phenylsulfonyl-3-phenyl-oxaziridin (**27**, 1,30 äq.) werden in 10 ml Dichlormethan gelöst und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand in wenig Dichlormethan aufgenommen. Bei Zugabe von Ethylacetat entstehen Kristalle. Diese werden über eine Fritte abgetrennt und mit 50 ml Petrolether gewaschen.

#### **Synthese von 8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-methylsulfinyl -8H-pyrido[2,3-d]-pyrimidin-7-on (19)**



Ausgehend von 350,0 mg **17** (1,00 äq., 1,15 mmol) und 300,0 mg **27** (1,30 äq., 1,50 mmol) erhält man **19** als weiße Kristalle.

**Ausbeute:** 370,0 mg (98%)

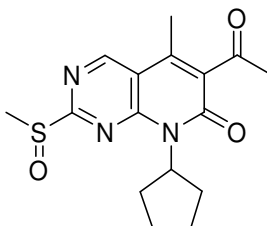
**Rf-Wert:** 0,42 (5% Methanol in Dichlormethan)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 9,12 (s, 1H, N=CH), 6,07 (quint., <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 2,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,01-2,26 (quint., <sup>3</sup>J = 9,0, 4H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,87-1,98 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,60-1,74 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)\*

**MS (ESI positiv):** m/z = 440,10 [M+Na]<sup>+</sup>, 418,24 [M+H]<sup>+</sup>



**Synthese von 6-Acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-methylsulfinyl-8H-pyrido[2,3-d]-pyrimidin-7-on (20)**



Ausgehend von 1,85 g **18** (1,00äq., 5,82 mmol) und 1,98 g **27** (1,30 äq., 7,50 mmol) erhält man **20** als hellgelbe Kristalle.

**Ausbeute:** 1,98 g (97%)

**Rf-Wert:** 0,62 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

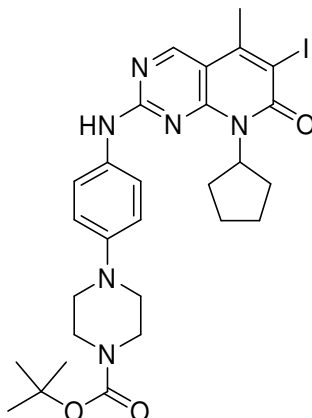
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 9,12 (s, 1H, N=CH), 5,95 (quint., <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 2,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,05-2,29 (m, 4H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,89-2,00 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,63-1,75 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)

**MS (ESI positiv):** m/z = 334,15 [M+H]<sup>+</sup>

### 6.3.16 Kupplung von Grundgerüst und Seitenkette

Die Synthese erfolgt in Analogie zu VanderWel *et al.*, 2005 [13]. **19** oder **20** (1,00 äq.) und **7** oder **8** (1,1 äq.) werden in 5 ml Toluol oder DMSO gelöst und für 16 h auf 100 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird mittels Eisbad abgekühlt. Eventuell entstehender Niederschlag wird abfiltriert und mit Toluol gewaschen. Das Filtrat wird mit 10 ml gesättigter NaCl-Lösung verdünnt und mit dreimal 5 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält **21**, **22** oder **23** als Feststoff. **21**, **22** oder **23** werden ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion eingesetzt.

**Synthese von tert-Butyl-4-(4-(8-cyclopentyl-6-iodo-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2-ylamino)phenyl)piperazine-1-carboxylat (**21**)**



Ausgehend von 420,0 mg **19** (1,00 äq, 1,00 mmol) und 305,8 mg **7** (1,10 äq., 1,10 mmol) in DMSO erhält man **21** als gelbbraunen Feststoff.

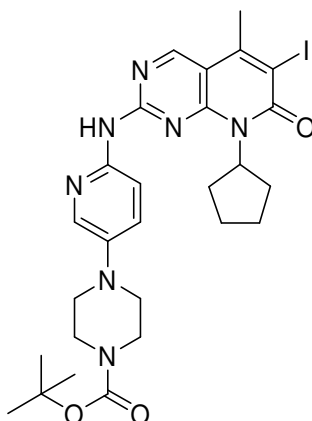
**Ausbeute:** 470,0 mg (75%)

**Rf-Wert:** 0,27 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,72 (s, 1H, N=CH), 7,47 (d, <sup>3</sup>*J* = 8,8 Hz, 2H, Phenyl-CH), 6,95 (d, <sup>3</sup>*J* = 8,8 Hz, 2H, Phenyl-CH), 5,97 (quint., <sup>3</sup>*J* = 8,4 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 3,60 (t, <sup>3</sup>*J* = 4,9 Hz, 4H Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,12 (t, <sup>3</sup>*J* = 4,9 Hz, 4H Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,66 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 2,22-2,30 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,98-2,06 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,78-1,87 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,56-1,68 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,49 (s, 9H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)\*

**MS (ESI positiv):** *m/z* = 631,27 [M+H]<sup>+</sup>, 531,23 [M-Boc+H]<sup>+</sup>

**Synthese von tert-Butyl-4-(6-(8-cyclopentyl-6-iodo-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2-ylamino)pyridin-3-yl)piperazine-1-carboxylat (**22**)**



Ausgehend von 172,4 mg **19** (1,00 äq, 0,42 mmol) und 138,1 mg **8** (1,10 äq., 0,45 mmol) in Toluol erhält man **22** als gelbbraunen Feststoff.

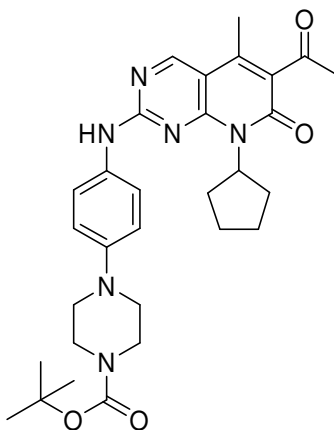
**Ausbeute:** 99,1 mg (38 %)

**Rf-Wert:** 0,21 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 9,41 (s, 1H, N=CH), 8,11-8,13 (m, 1H, Pyridin-CH), 7,92-7,95 (m, 1H, Pyridin-CH), 7,83-7,86 (m, 1H, Pyridin-CH), 6,36-6,46 (m, 1H, Cyclopentyl-CH), 3,74 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,66 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,40-2,50 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 2,23-2,33 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 2,04-2,14 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,83-1,93 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,49 (s, 9 H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**MS (ESI positiv):** m/z = 632,39 [M+H]<sup>+</sup>, 579,29 [M-(Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)+H]<sup>+</sup>, 532,25 [M-Boc+H]<sup>+</sup>

**Synthese von tert-butyl 4-(4-(6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydropyrido[2,3-d]pyrimidin-2-ylamino)phenyl)piperazin-1-carboxylat (23)**



Ausgehend von 200 mg **20** (1,00 äq, 0,59 mmol) und 180,4 mg **7** (1,10 äq., 0,64 mmol) in DMSO erhält man **23** als gelbbraunen Feststoff.

**Ausbeute:** 197,5 mg (61%)

**Rf-Wert:** 0,28 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

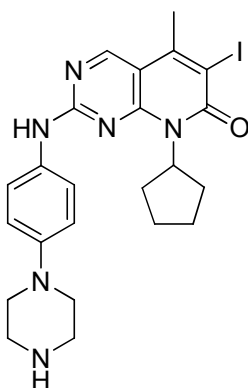
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,71 (s, 1H, N=CH), 7,46 (d, <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 2H, Phenyl-CH), 6,95 (d, <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, 2H, Phenyl-CH), 5,84 (quint., <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 3,56 (t, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,60 (t, <sup>3</sup>J = 5,0 Hz, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,54 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 2,35 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 2,22-2,30 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,89-1,97 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,78-1,88 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,58-1,65 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,49 (s, 9H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)\*

**MS (ESI positiv):** m/z = 569,47,36 [M+Na]<sup>+</sup>, 547,49 [M+H]<sup>+</sup>, 491,36 [M-(Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)+H]<sup>+</sup>

### 6.3.17 Entschützung

**21**, **22** oder **23** werden in 4 ml Dioxan gelöst und mit 4 ml 6 M HCl versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und durch Zugabe eines großen Überschusses an Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und anschließend mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1).

**Synthese von 8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-(4-(piperazin-1-yl)phenylamin)-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-on (CKIA).**



Ausgehend von 280,0 mg **21** (1,00 äq., 0,44 mmol)) erhält man **CKIA** als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 230,4 mg (98%)

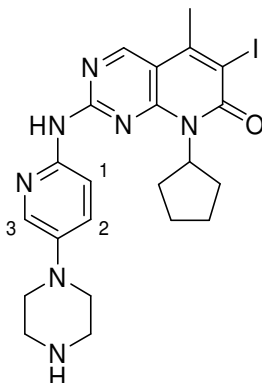
**Rf-Wert:** 0,00 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-D<sub>6</sub>):** δ 9,25 (br, s, 1H, NH), 8,90 (s, 1H, N=CH), 7,59 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, Phenyl-CH), 7,03 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, Phenyl-CH), 5,90 (quint., <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 3,35-3,31 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,25-3,20 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,20-2,10 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,95-1,85 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,80-1,70 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,54-1,52 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)\*

**MS (ESI positiv):** m/z = 531,23 [M+H]<sup>+</sup>

**Schmelzpunkt m<sub>p</sub>:** 200-201 °C

**Synthese von 8-Cyclopentyl-6-iod-5-methyl-2-(5-(piperazin-1-yl)pyridin-2-ylamin)-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-on (CKIB).**



Ausgehend von 35,8 mg **22** (1,00 äq., 0,06 mmol)) erhält man **CKIB** als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 31,1 mg (97%)

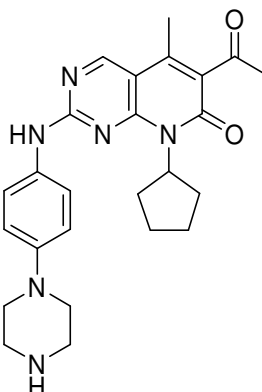
**Rf-Wert:** 0,00 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (Aceton-D<sub>6</sub>):** δ 9,15 (s, 1H), 8,23 (d, <sup>3</sup>*J* = 8,9 Hz, 1H, 1-H), 7,97 (d, <sup>4</sup>*J* = 3,0 Hz, 1H, 3-H), 7,53 (dd, <sup>3</sup>*J* = 9,0 Hz, <sup>4</sup>*J* = 3,0 Hz, 1H, 2-H), 6,08 (quint., <sup>3</sup>*J* = 8,9 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 3,55-3,51 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,45-3,40 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,80 (s, 3H), 2,24-2,16 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 2,12-2,04 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,92-1,80 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,72-1,64 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>).

**MS (ESI positiv):** *m/z* = 532,21 [M+H]<sup>+</sup>

**Schmelzpunkt *m<sub>p</sub>*:** >240 °C

**Synthese von 6-Acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(4-(piperazin-1-yl)phenylamin)-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-on (24)**



Ausgehend von 197,3 mg **23** (1,00 äq., 0,36 mmol) erhält man **24** als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 159,4 mg (98%)

**Rf-Wert:** 0,64 (10% Methanol in Chloroform)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,65 (s, 1H, N=CH), 7,46 (d, <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 2H, Phenyl-CH), 6,96 (d, <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, 2H, Phenyl-CH), 5,86 (quint., <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 3,18-3,23 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,10-3,12 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,54 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 2,35 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 2,22-2,30 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,89-1,97 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,178-1,88 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,58-1,65 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)

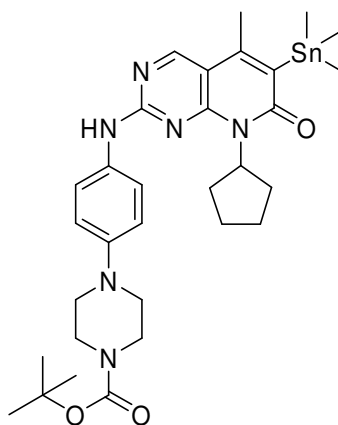
**MS (ESI positiv):** m/z = 469,44 [M+Na]<sup>+</sup>, 447,46 [M+H]<sup>+</sup>

**Schmelzpunkt *m<sub>p</sub>*:** >210 °C

### 6.3.18 Einführung der Trimethylstannylabgangsgruppe

Hexamethyldistannan (1,30 äq.) und Tetrakis(Triphenylphosphin)palladium(0) (0,05 äq.) werden in 10 ml Dioxan gelöst. **21** oder **22** (1,00 äq.) wird zugegeben und das Reaktionsgemisch für 8 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**Synthese von *tert*-Butyl-4-(6-(8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-6-trimethylstannyl-7,8-dihydro-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2-ylamino)phenyl)piperazine-1-carboxylat (**25**)**



Ausgehend von 300,0 mg **21** (1,00 äq., 0,47 mmol), 202,5 mg Hexamethyldistannan (1,30 äq., 0,62 mmol) und 27,0 mg Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0,05 äq., 0,02 mmol) erhält man **25** als graugelben Feststoff.

**Ausbeute:** 100,0 mg (32%)

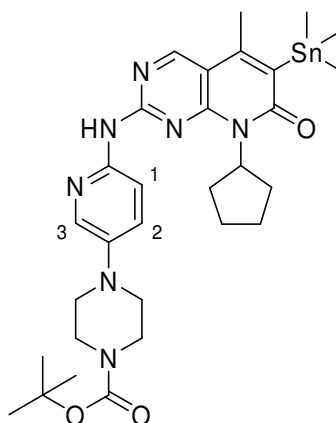
**Rf-Wert:** 0,46 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8,59 (s, 1H, N=CH), 7,42 (d, 2H,  $^3J = 8,9$  Hz, Phenyl-CH), 6,92 (d, 2H,  $^3J = 9,0$  Hz, Phenyl-CH), 5,69-5,73 (m, 1H, Cyclopentyl-CH), 3,68 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>), 3,55-3,60 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,10-3,06 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,23-2,25 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,70-1,90 (m, 4H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,55-1,65 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,43 (s, 9H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,36 (s, 9H,  $^1J = 29,0$  Hz,  $^1J = 27,0$  Hz, Sn-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**MS (ESI positiv):**  $m/z = 669,34$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

**Schmelzpunkt  $m_p$ :** 225-227 °C

**Synthese von *tert*-Butyl-4-(6-(8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-6-trimethylstannyl-7,8-dihydro-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2-ylamino)pyridin-3-yl)piperazine-1-carboxylat (26)**



Ausgehend von 72,6 mg **22** (1,00 äq., 0,13 mmol), 57,9 mg Hexamethyldistannan (1,30 äq., 0,19 mmol) und 10,0 mg Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0,05 äq., 0,01 mmol) erhält man **26** als graugelben Feststoff.

**Ausbeute:** 47,9 mg (55%)

**Rf-Wert:** 0,46 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8,70 (s, 1H, N=CH), 8,24 (d,  $^3J = 8,9$  Hz, 1H, 1-H), 8,00 (d,  $^4J = 3,0$  Hz, 1H, 3-H), 7,79 (dd,  $^3J = 9,0$  Hz,  $^4J = 3,0$  Hz, 1H, 2-H), 5,76 (quint.,  $^3J = 8,9$  Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 3,72 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>), 3,60 (t,  $^3J = 5,0$  Hz, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 3,14 (t,  $^3J = 4,9$  Hz, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 1,98-2,09 (m, 4H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,78-1,90 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,64-1,74 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,43 (s, 9H, Boc-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,32 (s, 9H,  $^1J = 29,0$  Hz,  $^1J = 27,0$  Hz, Sn-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

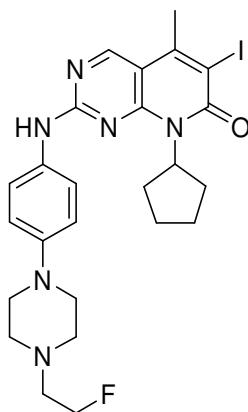
**MS (ESI positiv):**  $m/z = 692,23$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 592,10  $[\text{M}+\text{Na-Boc}]^+$

**Schmelzpunkt  $m_p$ :** 209-211 °C

### 6.3.19 Fluorethylierung

Die Synthese erfolgte in Abwandlung einer Vorschrift von Piel *et al.*, 2003 [164]. 1-Brom-2-fluorethan (1,00 äq.) **CKIA**, **CKIB** oder **24** (1,00 äq.), Kaliumcarbonat (3,00 äq.) und eine Spatelspitze Natriumiodid werden in 30 ml Dioxan gelöst und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch abgekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (5% Methanol in Chloroform). Um ein hochreines Produkt zu erhalten, erfolgte eine weitere säulenchromatographische Trennung an RP-18-Kieselgel (Acetonitril/Wasser 1:4-1:1).

#### Synthese von 8-Cyclopentyl-2-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)phenylamin)-6-iod-5-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**CKIC**)



Ausgehend von 318,0 mg **CKIA** (1,00 äq., 0,60 mmol), 76,0 mg 1-Brom-2-fluorethan (1,00 äq., 0,60 mmol) und 250 mg Kaliumcarbonat (3,00 äq., 1,80 mmol) erhält man **CKIC** als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 68,4 mg (20%)

**Rf-Wert:** 0,72 (10% Methanol in Chloroform)

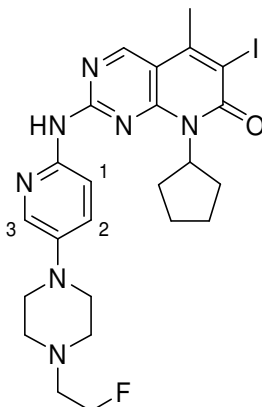
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,72 (s, 1H, N=CH), 7,45 (d, <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 2H, Phenyl-CH), 6,96 (d, <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 2H, Phenyl-CH), 5,97 (quint, <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 4,72 (dt, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 4,8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,F</sub> = 47,8 Hz, 2H, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,26-3,35 (m, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,81-2,95 (m, 6H, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,21-2,13 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,95-2,05 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,78-1,88 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,57-1,67 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)

**<sup>19</sup>F-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ -218,28 (m)

**MS (MALDI TOF/TOF):** m/z = 599,139 [M+Na]<sup>+</sup>, 577,159 [M+H]<sup>+</sup>



**Synthese von 8-Cyclopentyl-2-(5-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)pyridin-2-ylamino)-6-iodo-5-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-on (CKID)**



Ausgehend von 318,0 mg **CKIB** (1,00 äq., 0,60 mmol), 76,0 mg 1-Brom-2-fluorethan (1,00 äq., 0,60 mmol) und 250 mg Kaliumcarbonat (3,00 äq., 1,80 mmol) erhält man **CKID** als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 104,9 mg (31%)

**Rf-Wert:** 0,64 (10% Methanol in Chloroform)

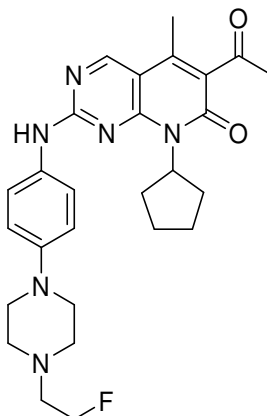
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,88 (s, 1H, N=CH), 8,16 (d, <sup>3</sup>*J* = 9,1 Hz, 1H, 1-H), 8,08 (d, <sup>4</sup>*J* = 2,8 Hz, 1H, 3-H), 7,32 (dd, <sup>3</sup>*J* = 9,0 Hz, <sup>4</sup>*J* = 3,0 Hz, 1H, 2-H), 5,98 (quint., <sup>3</sup>*J* = 8,7 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 4,67 (dt, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4,8 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>H,F</sub> = 47,8 Hz, 2H, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,26 (t, <sup>3</sup>*J* = 4,5 Hz, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,79-2,88 (m, 6H, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,67 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>), 2,25-2,35 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 2,04-2,14 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,82-1,92 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,63-1,73 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 23,92 (CH<sub>3</sub>), 26,04 und 28,19 (doppelte Intensität, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 49,17 und 53,17 (doppelte Intensität, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 55,19 (Cyclopentyl-CH), 58,00 (<sup>2</sup>*J*<sub>C,F</sub> = 19,9 Hz, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 81,68 (<sup>1</sup>*J*<sub>C,F</sub> = 170,1 Hz, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 99,39, 107,68, 113,32, 125,94, 136,63, 143,17, 145,17, 148,66, 155,41, 156,68, 157,91, 159,61

**<sup>19</sup>F-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ -218,38 (m)

**MS (MALDI TOF/TOF):** *m/z* = 600,139 [M+Na]<sup>+</sup>, 578,159 [M+H]<sup>+</sup>

Synthese von 6-Acetyl-8-cyclopentyl-2-(4-(4-(2-fluorethyl)piperazin-1-yl)phenylamin)-5-methylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-on (CKIE)



Ausgehend von 450,0 mg **24** (1,00 äq., 1,00 mmol), 150,0 mg 1-Brom-2-fluorethan (1,00 äq., 1,00mmol) und 450 mg Kaliumcarbonat (3,00 äq., 3,00 mmol) erhält man **CKIE** als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 42,3 mg (19%)

**Rf-Wert:** 0,64 (10% Methanol in Chloroform), 0,15 (Acetonitril/Wasser 1:1)

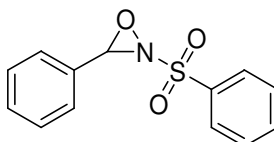
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,72 (s, 1H, N=CH), 8,10 (br s, 1H, NH) 7,47 (d, <sup>3</sup>*J* = 8,9 Hz, 2H, Phenyl-CH), 6,93 (d, <sup>3</sup>*J* = 9,0 Hz, 2H, Phenyl-CH), 5,81 (quint, <sup>3</sup>*J* = 9,0 Hz, 1H, Cyclopentyl-CH), 4,64 (dt, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4,6 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>H,F</sub> = 47,5 Hz, 2H, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,26 (t, <sup>3</sup>*J* = 4,5 Hz, 4H, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,81-2,95 (m, 6H, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 2,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,27-2,21 (m, 5H, CH<sub>3</sub>, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,70-1,91 (m, 4H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 1,55-1,65 (m, 2H, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 13,89 und 17,19 (CH<sub>3</sub>), 25,56 und 27,93 (doppelte Intensität, Cyclopentyl-CH<sub>2</sub>), 49,25 und 53,72 (doppelte Intensität, Piperazin-CH<sub>2</sub>), 58,66 (<sup>2</sup>*J*<sub>C,F</sub> = 19,8 Hz, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 68,7, 70,75, 82,01 (<sup>1</sup>*J*<sub>C,F</sub> = 166,4 Hz, F-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 117,06 und 122,62 (doppelte Intensität, Phenyl-CH), 130,09, 131,16, 142,27, 148,35, 155,93, 157,51, 156,59, 161,71

**<sup>19</sup>F-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ -218,41 (m)

**MS (MALDI TOF/TOF):** *m/z* = 493,317 [M+H]<sup>+</sup>

### 6.3.20 Synthese von 2-Phenylsulfonyl-3-phenyl-oxaziridin (27)



Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Davis *et al.*, 1988 [162]. In einem Dreihalskolben, der mit einem Thermometer ausgestattet ist, werden unter Argonatmosphäre 6,80 g Kaliumcarbonat (3,50 äq., 28,52 mmol) in 50 ml dest. Wasser gelöst und mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2,00 g *N*-Benzylidenbenzolsulfonamid (1,00 äq., 8,15 mmol) in 80 ml Toluol. Bei der Zugabe darf die Temperatur der Lösung 20 °C nicht überschreiten. Das Reaktionsgemisch wird stark gerührt, so dass es zur Phasenvermischung kommt. Eine Lösung aus 6,04 g Oxon (1,20 äq., 9,80 mmol) in 50 ml dest. Wasser wird so langsam zugegeben, dass die Temperatur nicht über 20 °C steigt. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC überprüft, die Reaktion ist beendet, sobald das Sulfonamid aufgebraucht ist. Anschließend wird die organische Phase abgenommen und die wässrige Phase mit 20 ml Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 20 ml 10%iger Natriumsulfatlösung gewaschen und im Anschluss über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, wobei die Badtemperatur 30 °C nicht überschreiten darf. Lösungsmittelreste müssen im Hochvakuum entfernt werden. Man erhält **27** als farblose Kristalle. Die Verbindung ist nach vollständiger Trocknung bei Lagerung im Kühlschrank (<4 °C) und lichtgeschützter Verpackung stabil.

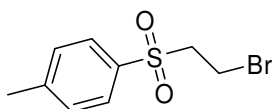
**Ausbeute:** 1,99 g (97%)

**Rf-Wert:** 0,44 (Ethylacetat/Petrolether 1:4)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,30-8,02 (m, 10H, Phenyl-CH), 5,41 (s, 1H, Benzyl-CH)

**MS (ESI positiv):** m/z = 284,04 [M+Na]<sup>+</sup>, m/z = 262,05 [M+H]<sup>+</sup>

### 6.3.21 Synthese von 1-Brom-2-toluolsulfonylethan (28)



5,00 g Bromethanol (1,10 äq., 40,00 mmol) werden unter Argonatmosphäre in 30 ml Dichlormethan gelöst. Unter Rühren werden 5,06 g Pyridin (2,00 äq., 64,00 mmol) so langsam zugetropft, dass die Temperatur der Reaktionsgemischs unter 35 °C bleibt. Anschließend werden 8,00 g Toluolsulfonsäurechlorid (1,00 äq., 32,00 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bis zum vollständigen Umsatz des Chlorides bei Raumtemperatur gerührt (Kontrolle mittels DC). Das Reaktionsgemisch wird mit 10 ml 2 M HCl angesäuert. Die organische Phase wird abgetrennt, mit dest. Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum

entfernt. Man erhält **28** als farbloses Öl. Die Reinheit wurde mittels HPLC überprüft und beträgt >98%.

**Ausbeute:** 1,99 g (97%)

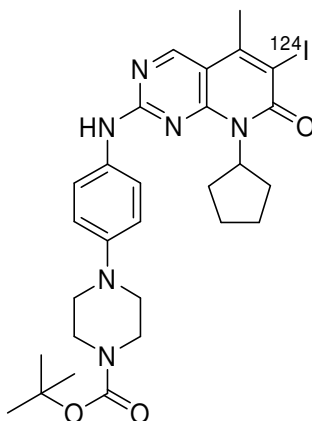
**Rf-Wert:** 0,48 (Ethylacetat/Petrolether 1:2)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,79-7,86 (m, 2H, Phenyl-CH), 7,35-7,39 (m, 2H, Phenyl-CH) 4,25-4,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>) 3,44-3,54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,44-2,51 (m, 1H, Toluoyl-CH<sub>3</sub>)

**MS (ESI positiv):** m/z = 286,98 [M+Na]<sup>+</sup>, m/z = 266,92 [M+H]<sup>+</sup>

## 6.4 Radiochemische Methoden

### 6.4.1 Synthese von [<sup>124</sup>I]29



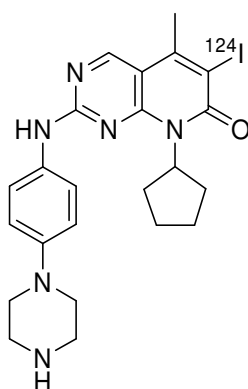
5 mg Markierungsvorstufe **25** werden in 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und in 50 µl Aliquoten in 1,5 ml *loBind*-Eppendorf (Eppendorf DNA *LoBind* Microcentrifuge Tubes) Reaktionsgefäß pipettiert. Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und die Markierungsvorstufe bei -70 °C gelagert.

Zur Radiomarkierung wird ein Aliquot der Markierungsvorstufe **25** in 50 µl DMSO aufgenommen und mit 50 µl 5% Eisessig in MeOH verdünnt. Die Lösung wird in ein *Iodotube*<sup>TM</sup> (mit Iodogen beschichtetes Reagenzglas mit Gummistopfen) pipettiert. Das *loBind*-Eppendorf Reaktionsgefäß mit 100 µl 5% Eisessig in MeOH nachspülen. Die gewünschte Menge [<sup>124</sup>I]NaI (1-275 MBq, ca. 3 MBq/µl in 0.1 M Natriumhydroxidlösung) aus dem Transportgefäß (3 ml KIMAX-V-Vial) in das *Iodotube*<sup>TM</sup> überführen und die Aktivität des Reaktionsgemischs am Aktivimeter bestimmen (Anfangsaktivität). Das Reaktionsgemisch für 10 min bei Raumtemperatur (22-25 °C) im Thermomixer inkubieren. Nach 10 min wird die Umsetzung des [<sup>124</sup>I]NaI mittels RadioDc kontrolliert (Ethylacetat/Petrolether 1:1). Liegt der Anteil an unumgesetzten [<sup>124</sup>I]NaI unter 10% wird die Reaktion durch Zugabe von 50 µl

gesättigter Natriumhydrogensulfidlösung beendet. Das Reaktionsgemisch wird in ein 2 ml *loBind*-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Umsetzung erfolgt ohne Reinigung.

<b>Radiochemische Reinheit<sup>20</sup>:</b>	>92%
<b>Rf-Wert [<sup>124</sup>I]NaI:</b>	0,04 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)
<b>Rf-Wert [<sup>124</sup>I]28:</b>	0,54 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)
<b>t<sub>R</sub> (a, CIII, GI):</b>	14,7 min

### 6.4.2 Synthese von [<sup>124</sup>I]CKIA



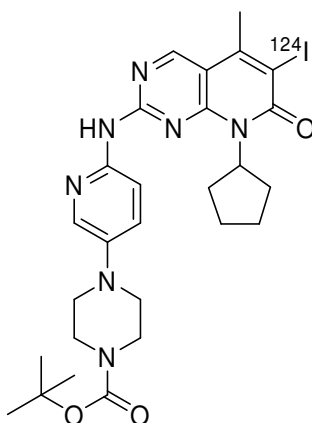
Das Reaktionsgemisch bestehend aus [<sup>124</sup>I]29, [<sup>124</sup>I]NaI und Natriumhydrogensulfit in DMSO / 5% Eisessig in Methanol (1:3) wird mit 200 µl Trifluoressigsäure versetzt und für 20 min bei 50°C im Thermomixer inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der gesamte Reaktionsansatz (max. 500 µl) mittels semipräparativer HPLC (System sII, CIV, Gradient V, 3 ml/min)) gereinigt. Die Produktfraktion (13.2-14.0 min) wird in einem 50 ml Zentrifugationsgefäß (*Falcon-Tube™* mit Standfuß) aufgefangen und mit 20 ml dest. Wasser verdünnt. Die verdünnte HPLC-Fraktion wird mit einer 25 ml Spritze aufgenommen und das Produkt mittels Festphasenextraktion an einer Waters Sep-Pak-tC-18Plus Kartusche vom Lösungsmittel getrennt. Die Kartusche wird mit 10 ml dest. Wasser gewaschen und das Produkt mit 1 ml Ethanol in ein 1,5 ml *loBind*-Eppendorf Reaktionsgefäß eluiert. Das Lösungsmittelvolumen wird anschließend im Stickstoffstrom auf 300-400 µl reduziert.

Ausgehend von 36,0 MBq [<sup>124</sup>I]NaI erhält man innerhalb von 104 min 11.8 MBq (33.6%, zerfallskorr.) [<sup>124</sup>I]CKIA, inklusive der Synthese von [<sup>124</sup>I]29 und semipräparativer Reinigung. Die spezifische Aktivität beträgt 35 GBq/µmol.

<sup>20</sup> Die radiochemische Reinheit stellt den Anteil des Produktes im Reaktionsgemisch dar.

<b>Radiochemische Aubeute:</b>	24-34%
<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>98%
<b>Chemische Reinheit:</b>	>20%
<b>Rf-Wert:</b>	0,00 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)
<b>t<sub>R</sub> (a, CIII, GI):</b>	5,9 min
<b>logD<sub>7,4</sub> (exp.):</b>	2,76 ± 0,11
<b>A<sub>s,0</sub>:</b>	16,9±12,8 GBq/μmol

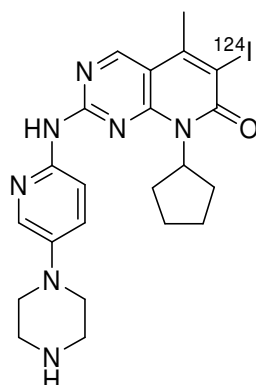
#### 6.4.3 Synthese von [<sup>124</sup>I]30



Die Synthese von [<sup>124</sup>I]30 erfolgt analog der Synthese von [<sup>124</sup>I]29 unter Einsatz von 50 μl Markierungsvorstufe **26** (5 mg/ml in DMSO), 150 μl 5% Eisessig in Methanol und der gewünschten Menge [<sup>124</sup>I]NaI (28-189 MBq, ca. 3 MBq/μl in 0.1 M Natriumhydroxidlösung). Das Produkt liegt im Reaktionsgemisch im 2 ml *loBind*-Eppendorf Reaktionsgefäß vor.

<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>90%
<b>t<sub>R</sub> (a, CIII, GII):</b>	11,9 min

#### 6.4.4 Synthese von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB



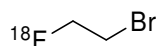
Die Synthese von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB erfolgte analog der Synthese von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA. Ausgehend von 186,1 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]NaI erhält man in einer Gesamtsynthesedauer von 107 min 32,7 MBq [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB (17.8%, zerfallskorr.), inklusive der Synthese von [ $^{124}\text{I}$ ]30 und der semipräparativen Reinigung (sII, CIV, GV, 1,5 ml/min, Produktfraktion: 15,7-17,3 min). Die spezifische Aktivität beträgt 35 GBq/ $\mu\text{mol}$ .

<b>Radiochemische Aubeute:</b>	17-27%
<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>98%
<b>Chemische Reinheit:</b>	>20%
<b>Rf-Wert:</b>	0,00 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)
<b><math>t_R</math> (a, CIII, GII):</b>	4,2 min
<b>logD<sub>7,4</sub> (exp.):</b>	2,00 $\pm$ 0,04
<b>A<sub>s,0</sub>:</b>	21,8 $\pm$ 3,2 GBq/ $\mu\text{mol}$

#### 6.4.5 Trocknung [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid für manuelle Synthesen

Zum [ $^{18}\text{F}$ ]fluoridhaltige Targetwasser im Transportgefäß wird 1 ml dest. Wasser gegeben, die Lösung mittels 5 ml Spritze aus dem Transportgefäß entnommen und anschließend über eine SepPak QMA Anionentauscherkartusche (Waters) gegeben. Das [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid wird mit 1.5 ml Kryptofixlösung von der Kartusche in ein Reaktionsgefäß eluiert. Die Aktivität des Eluats wird im Aktivimeter gemessen und als Anfangsaktivität erfasst. Die Lösung wird unter zwei-/dreimaliger Zugabe von 2-3 ml Acetonitril bei 120 °C im Stickstoffstrom eingedampft.

#### 6.4.6 Manuelle Synthese von 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]Fluorethan ([<sup>18</sup>F]BFE)



##### **Variante AM: : 2-Bromethyl-*p*-nitrobenzolsulfonat als Markierungsvorstufe**

Zu 453 MBq getrocknetem [<sup>18</sup>F]Fluorid werden 5 mg 2-Bromethyl-*p*-nitrobenzolsulfonat in 1 ml Acetonitril gegeben und das Reaktionsgemisch in einem fest verschlossenen Reaktionsgefäß für 10 min auf 80 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur abgekühlt und in einer Spritze mit 20 ml dest. Wasser verdünnt. Das Gemisch wird über eine SepPak tC18 Plus Kartusche und direkt im Anschluss über eine Chromabond® HR-P Kartusche gegeben. Die HR-P-Kartusche wird mit 1 ml Acetonitril eluiert. Man erhält 316 MBq [<sup>18</sup>F]BFE (80% zerfallskorr.) in einer Synthesedauer von 21 min, ohne die Trocknung des Fluorids. [<sup>18</sup>F]BFE wird ohne weitere Reinigung für nachfolgende Syntheseschritte eingesetzt.

<b>Radiochemische Aubeute:</b>	80%
<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>97%
<b>t<sub>R</sub> (a, Cl, GIII):</b>	9,1 min

##### **Variante BM: 1-Brom-2-toluolsulfonylethan (28) als Markierungsvorstufe**

Die Synthese erfolgt analog der Variante A. Ausgehend von 515 MBq getrocknetem [<sup>18</sup>F]Fluorid und 5 mg **28** erhält 190 MBq [<sup>18</sup>F]BFE (44% zerfallskorr.) in einer Synthesedauer von 29 min, ohne die Trocknung des Fluorids. [<sup>18</sup>F]BFE wird ohne weitere Reinigung für nachfolgende Syntheseschritte eingesetzt.

<b>Radiochemische Aubeute Ø:</b>	44%
<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>86%
<b>t<sub>R</sub> (a, Cl, GIII):</b>	9,1 min

#### 6.4.7 Automatisierte Synthese von 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]Fluorethan ([<sup>18</sup>F]BFE) im Synthesemodul

##### **Variante AS: 2-Bromethyl-*p*-nitrobenzolsulfonat als Markierungsvorstufe**

Die Vorbereitung der Syntheseapparatur besteht aus dem Einfüllen aller für die Synthese von [<sup>18</sup>F]BFE notwendigen Substanzen und dem Einsetzen der benötigten Kartuschen.



- Vial 1: 1.5 ml Kryptofixlösung
- Vial 2: 3 ml trockenes Acetonitril
- Vial 3: 3 mg : 2-Bromethyl-*p*-nitrobenzolsulfonat in 1 ml MeCN
- Vial 4: 8 ml dest. Wasser
- Vial 5: 10 ml dest. Wasser
- Kartuschen: SepPak tC18 Plus, SepPak QMA, Chromabond® HR-P
- Vorratsgefäß: 10 ml dest Wasser

Das [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid wird mittels SepPak QMA-Anionentauscherkartusche vom Targetwasser abgetrennt und anschließend mit der Kryptofixlösung aus Vial 1 von der Kartusche in den Reaktor eluiert. Die Anionentauscherkartusche wird vor und nach der Elution im Aktivimeter ausgemessen. Die Aktivitätsdifferenz entspricht der Startaktivität. Nach azeotroper Trocknung unter Zugabe von Acetonitril bei 120 °C für 10 min wird das Reaktorgefäß auf 40 °C gekühlt. Anschließend wird die Markierungsvorstufe aus Vial 3 zum Rückstand gegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird unter Rühren für 10 min auf 80 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen des Reaktors auf 40 °C endet die Synthese. Das Reaktionsgemisch wird mit 8 ml dest. Wasser aus Vial 4 verdünnt und per Stickstoffstrom in das Vorratsgefäß transferiert. Das Produktgemisch liegt nun in 18 ml dest. Wasser vor. Das Gemisch wird über eine SepPak tC18 Plus Kartusche und direkt im Anschluss über die Chromabond® HR-P Kartusche gegeben. Die HR-P-Kartusche wird aus dem Synthesemodul entnommen und mit 1 ml Acetonitril/DMF (1:1) in ein verschließbares Glasvial eluiert.

Ausgehend von 10,8 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid erhält man in einer Gesamtsynthesezeit von 36 min 3,2 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]BFE (36% zerfallskorr.). Das Produkt wird ohne weitere Reinigung für die folgenden Syntheseschritte eingesetzt.

<b>Radiochemische Aubeute:</b>	36-48% (n = 3)
<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>98%
<b>Chemische Reinheit:</b>	<1%
<b>Anteil Markierungsvorstufe:</b>	>98%
<b>t<sub>R</sub> (a, Cl, G III):</b>	9,1 min

### **Variante BS: 1-Brom-2-toluolsulfonylethan (28) als Markierungsvorstufe**

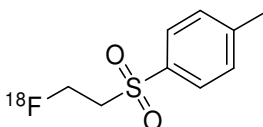
Die Vorbereitung der Syntheseapparatur erfolgt analog Variante AS mit folgender Abweichung:

- Vial 3: 10-25 mg **28** in 1 ml MeCN

Ausgehend von 8,1 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid erhält man in einer Gesamtsynthesezeit von 39 min 3,0 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]BFE (46% zerfallskorr.). Das Produkt wird ohne weitere Reinigung für die folgenden Syntheseschritte eingesetzt.

<b>Radiochemische Aubeute Ø:</b>	41% (n = 14)
<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>86%
<b>Chemische Reinheit:</b>	>20%
<b>Anteil Markierungsvorstufe:</b>	<1%
<b>t<sub>R</sub> (a, Cl, GIII):</b>	9,1 min

### 6.4.8 Manuelle Synthese von 1- $^{18}\text{F}$ Fluorethyl-2-tosylat ( $^{18}\text{F}$ FETos)



Zu 471,0 MBq getrocknetem [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid werden 4 mg 1,2-Ditoluolsulfonylethan in 1 ml Acetonitril gegeben und das Reaktionsgemisch in einem fest verschlossenen Reaktionsgefäß für 5 min auf 80°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur abgekühlt und ohne weitere Reinigung für nachfolgende Syntheseschritte eingesetzt.

<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>87%
<b>Rf-Wert [<math>^{18}\text{F}</math>]F<sup>-</sup></b>	0,00 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)
<b>Rf-Wert [<math>^{18}\text{F}</math>]FETos:</b>	0,87 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)
<b>t<sub>R</sub> (a, CIII, isokratisch I):</b>	16,4 min

### 6.4.9 Automatisierte Synthese von 1- $^{18}\text{F}$ Fluorethyl-2-tosylat ( $^{18}\text{F}$ FETos)

Die Vorbereitung der Syntheseapparatur besteht aus dem Einfüllen aller für die Synthese von [ $^{18}\text{F}$ ]FETos notwendigen Substanzen und dem Einsetzen der benötigten Kartuschen.

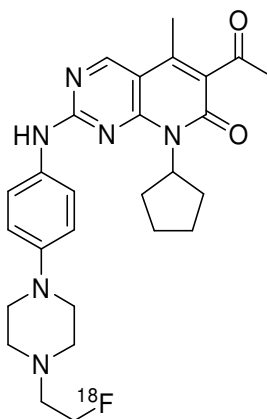
- Vial 1: 1.5 ml Kryptofixlösung
- Vial 2: 3 ml trockenes Acetonitril
- Vial 3: 5 mg 1,2-Ditoluolsulfonylethan in 1 ml MeCN
- Kartuschen: Anionenaustauscherkartusche

Das [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid wird mittels Anionentauscherkartusche vom Targetwasser abgetrennt und anschließend mit der Kryptofixlösung aus Vial 1 von der Kartusche in den Reaktor eluiert. Die Anionentauscherkartusche wird vor und nach der Elution im Aktivimeter ausgemessen. Die Aktivitätsdifferenz entspricht der Startaktivität. Nach azeotroper Trocknung unter Zugabe von Acetonitril bei 120 °C für 10 min wird das Reaktorgefäß auf 40 °C gekühlt. Anschließend wird die Markierungsvorstufe aus Vial 3 zum Rückstand gegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird unter Rühren für 5 min auf 80 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen des Reaktors auf 40 °C endet die Synthese.

Ausgehend von 2,6 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid erhält man in einer Gesamtsynthesezeit von 35 min 2,0 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]FETos mit einer radiochemischen Reinheit von 75%. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung für die folgenden Syntheseschritte eingesetzt.

<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>70%
<b>Rf-Wert [<math>^{18}\text{F}</math>]F<sup>-</sup></b>	0,00 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)
<b>Rf-Wert [<math>^{18}\text{F}</math>]FETos:</b>	0,87 (Ethylacetat/Petrolether 1:1)
<b>t<sub>R</sub> (a, CIII, isokratisch I):</b>	16,4 min

### 6.4.10 Synthese von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE



#### Variante A

Die Radiomarkierung von **24** erfolgte ausgehend von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE dargestellt nach Variante BS. In einem verschließbaren konischen Glasvial (Fassungsvolumen 2-3 ml) mit zwei neuen, undurchstochenen Septen im Deckel werden 9,0 mg Natriumiodid (4,20 äq., 60,0 µmol), 10 µl 1 M NaOH und 6,5 mg **24** (1,00 äq., 14,6 µmol) vorgelegt. Das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE wird mit 1 ml DMF direkt in das Glasvial eluiert. Das Glasvial wird fest verschlossen und für 20 min auf 130 °C erhitzt. Anschließend wird das Vial mittels flüssigem Stickstoff abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wird mit 4 ml dest. Wasser verdünnt und mittels semipräparativer HPLC (sl, CII, isokratisch II) getrennt. Die

Produktfraktion (22,7-24,3 min) wird im Auffanggefäß des Moduls aufgefangen und mit 20 ml dest. Wasser verdünnt. Das Produkt wird mittels Festphasenextraktion an einer Waters Sep-Pak-tC-18Plus Kartusche vom Lösungsmittel getrennt und das Produkt mit 1 ml Ethanol in ein 1,5 ml *loBind*-Eppendorf Reaktionsgefäß eluiert. Das Lösungsmittelvolumen wird anschließend im Stickstoffstrom auf 300-400 µl reduziert. Ausgehend von 2,1 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]BFE erhält man innerhalb von 86 min 273 MBq (22%, zerfallskorr.) [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE, inklusive semipräparativer Reinigung.

### Variante B

Die Synthese erfolgte analog einer Vorschrift von Veach *et al.*, 2007 [176]. Für die Radiomarkierung werden 9,0 mg Natriumiodid (4,20 äq., 60,0 µmol), 5,0 mg Cäsiumcarbonat (1,10 äq., 15,3 µmol) und 6,5 mg **24** (1,00 äq., 14,6 µmol) in einem verschließbaren konischen Glasvial (Fassungsvolumen 2-3 ml) vorgelegt und das [ $^{18}\text{F}$ ]BFE mit 1 ml Acetonitril/DMF (1:1) von der HRP-Kartusche direkt in das Glasvial eluiert. Die Reaktion dauert 40 min bei 130 °C. Die Aufarbeitung erfolgt analog Variante A. Ausgehend von 2,6 GBq [ $^{18}\text{F}$ ]BFE erhält man innerhalb von 73 min 176 MBq (11%, zerfallskorr.) [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE, inklusiv semipräparativer Reinigung. Die spezifische Aktivität beträgt 25,3 GBq/µmol.

Ausgehen von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid erhält man innerhalb von ca. 125 min durchschnittlich  $3 \pm 1\%$  radiochemische Ausbeute (zerfallskorrigiert,  $n = 8$ ,  $\text{RCA}_{\text{max}} = 9\%$ ).

<b>Radiochemische Aubeute:</b>	3-22% (ausgehend von [ $^{18}\text{F}$ ]BFE)
<b>Radiochemische Reinheit:</b>	>98%
<b>Chemische Reinheit:</b>	>40%
<b><math>t_R</math> (a, CIII, GII):</b>	6,8 min
<b><math>\log D_{7,4}</math> (exp.):</b>	$2,21 \pm 0,04$
<b><math>A_s</math>:</b>	$22,4 \pm 3,5$ GBq/µmol

## 7. Literaturverweise

- [1] Robert Koch Institut: Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. *Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.*; **6. überarbeitete Auflage** (2008).
- [2] Statistisches Bundesamt Deutschland ; Gustav-Stresemann-Ring 11; D-65189 Wiesbaden <http://www.destatis.de/> (2009).
- [3] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molekularbiologie der Zelle. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* (2004) 1533-1592.
- [4] An, H. X.; Beckmann, M. W.; Reifemberger, G.; Bender, H. G.; Niederacher, D. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *Am J Clin Pathol* **154** (1999) 113-118.
- [5] Ortega, S.; Malumbres, M.; Barbacid, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta-Rev Cancer* **1602** (2002) 73-87.
- [6] Perry, A.; Anderl, K.; Borell, T. J.; Kimmel, D. W.; Wang, C. H.; O'Fallon, J. R.; Feuerstein, B. G.; Scheithauer, B. W.; Jenkins, R. B. Detection of p16, RB, CDK4, and p53 gene deletion and amplification by fluorescence in situ hybridization in 96 gliomas *Am J Clin Pathol* **112** (1999) 801-809.
- [7] Wei, G.; Lonardo, F.; Ueda, T.; Kim, T.; Huvos, A. G.; Healey, J. H.; Ladanyi, M. CDK4 genen amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A Gene alterations and mapping of 12q13 amplicons. *Int J Cancer* **80** (1999) 199-204.
- [8] Barvian, M.; Boschelli, D. H.; Cossrow, J.; Dobrusin, E.; Fattaey, A.; Fritsch, A.; Fry, D.; Harvey, P.; Keller, P.; Garrett, M.; La, F.; Leopold, W.; McNamara, D.; Quin, M.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Toogood, P.; Wu, Z. P.; Zhang, E. L. Pyrido 2,3-d pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* **43** (2000) 4606-4616.
- [9] Fry, D. W.; Bedford, D. C.; Harvey, P. H.; Fritsch, A.; Keller, P. R.; Wu, Z. P.; Dobrusin, E.; Leopold, W. R.; Fattaey, A.; Garrett, M. D. Cell cycle and biochemical effects of PD 0183812 - a potent inhibitor of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *J Biol Chem* **276** (2001) 16617-16623.
- [10] Fry, D. W.; Harvey, P. J.; Keller, P. R.; Elliott, W. L.; Meade, M.; Trachet, E.; Albassam, M.; Zheng, X. X.; Leopold, W. R.; Pryer, N. K.; Toogood, P. L. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* **3** (2004) 1427-1437.
- [11] Toogood, P. L. Cyclin-dependent kinase inhibitors for treating cancer. *Med Res Rev* **21** (2001) 487-498.
- [12] Toogood, P. L.; Harvey, P. J.; Repine, J. T.; Sheehan, D. J.; VanderWel, S. N.; Zhou, H. R.; Keller, P. R.; McNamara, D. J.; Sherry, D.; Zhu, T.; Brodfuehrer, J.; Choi, C.; Barvian, M. R.; Fry, D. W. Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J. Med. Chem.* **48** (2005) 2388-2406.
- [13] VanderWel, S. N.; Harvey, P. J.; McNamara, D. J.; Repine, J. T.; Keller, P. R.; Quin, J.; Booth, R. J.; Elliott, W. L.; Dobrusin, E. M.; Fry, D. W.; Toogood, P. L. Pyrido 2,3-d pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *J Med Chem* **48** (2005) 2371-2387.
- [14] Campbell, N. A. Biologie. *Spectrum Akademischer Verlag Heidelberg • Berlin • Oxford, 1. Auflage* (1996).

- [15] Grimmeler, M. Identifikation und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p27Kip1. *Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München* (2002).
- [16] Howard, A.; Pelc, S. R. Nuclear incorporation of P32 as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res* **2** (1951) 178-187.
- [17] Hengst, L. Regulation der Zellproliferation. *Max-Planck-Institu für Biochemie - Jahrbuch* (2003) 1-7.
- [18] Johnson, D. G.; Walker, C. L. Cyclins and Cell Cycle Checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39** (1999) 295-312.
- [19] Pardee, A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71** (1974) 1286-1290.
- [20] Pardee, A. B. G1 Events and regulation of cell proliferation. *Science* **246** (1989) 603- 608.
- [21] Zetterberg, A.; Larsson, O.; Wiman, K. G. What is the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* **7** (1995)) 835-842
- [22] Imbach, P. 2,6,9- trisubstituted Purines: optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **9** (1999) 91-96.
- [23] Richardson, C. M. Triazolo[1,5-a]pyrimidines as novel CDK2 inhibitors: Protein structure-guided design and SAR. *Bioorg Med Chem Lett* **16** (2006) 1353-1357.
- [24] Shimamura, T.; Shibata, J.; Kurihara, H.; Mita, T.; Otsuki, S.; Sagara, T.; Hirai, H.; Iwasawa, Y. Identification of potent 5-pyrimidinyl-2-aminothiazole CDK4, 6 inhibitors with significant selectivity over CDK1, 2, 5, 7, and 9. *Bioorg Med Chem Lett* **16** (2006) 3751-3754.
- [25] Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13** (1997) 261-291.
- [26] Sherr, C. J. Cancer Cell Cycles. *Science* **274** (1996) 1672-1677.
- [27] Macaluso, M.; Montanari, M.; Giordano, A. Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene* **25** (2006) 5263-5267.
- [28] Diehl, J. A.; Cheng, M. G.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12** (1998) 3499-3511.
- [29] Sherr, C. J. Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73** (1993) 1059-1065.
- [30] Ekholm, S. V.; Zickert, P.; Reed, S. I.; Zetterberg, A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol* **21** (2001) 3256-3265.
- [31] Planas-Silva, M. D.; Weinberg, R. A. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* **9** (1997) 768-772.
- [32] Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. Molecular Cell biology. *W. H. Freeman and Company* **4** (2000).
- [33] Lundberg, A. S.; Weinberg, R. A. Functional inactivationof the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk-complexes. *Mol Cell Biol* **18** (1998) 2796-2809.
- [34] Pagano, M.; Pepperkok, R.; Verde, F.; Ansorge, W.; Draetta, G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* **11** (1992).
- [35] Pines, J.; Hunter, T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346** (1990) 760-763.
- [36] Dreyer, M. K.; Borchering, D. R.; Dumont, J. A.; Peet, N. P.; Tsay, J. T.; Wright, P. S.; Bitonti, A. J.; Shen, J.; Kim, S. Crystal structure of human cyclindependentkinase 2 in complex with the Adenine-derived inhibitor H717. *J Med Chem* **44** (2001) 524-530.
- [37] Vidal, J. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* **224** (1994).
- [38] Hannon, G. J.; Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* **371** (1994) 257-261.

- [39] Serrano, M.; Hannon, G. J.; Beach, D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin-D/CDK4. *Nature* **366** (1993) 704-707.
- [40] Guan, K. L.; Jenkins, C. W.; Li, Y.; Nichols, M. A.; Wu, X. Y.; O'Keefe, C. L.; Materna, A. G.; Xiong, Y. Growth suppression by p18, a p16(ink4/MTS1)-related and p17(ink4/MTS2)-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type function. *Genes Dev* **8** (1994) 2939-2952.
- [41] Hirai, H.; Roussel, M. F.; Kato, J. Y.; Ashmun, R. A.; Sherr, C. J. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* **15** (1995) 2672-2681.
- [42] Chan, F. K.; Zhang, J.; Cheng, L.; Shapiro, D. N.; Winoto, A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* **15** (1995).
- [43] Vidal, A.; Koff, A. Cell-Cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* **247** (2000) 1-15.
- [44] Jaramillo, C. Aminoimidazol [1,2-a]pyridines as a new structural class of cyclin-dependent kinase inhibitors. Part 1: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* **14** (2004) 6095-6099.
- [45] Dopke, J. Die Rolle der Apoptose in in vitro Modellen neuraler Degeneration. *Dissertation, Fakultät der Biologie der Ruhr Universität Bochum* (2001).
- [46] Misra, R. N. N- (Cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole Inhibitors of Cyclin - Dependent Kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-Dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS-387032), a highly efficacious and selective antitumor agent. *J Med Chem* **47** (2004) 1719- 1728.
- [47] Misra, R. N. Synthesis and biological activity of N-aryl-2-aminothiazoles: potent pan inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg Med Chem Lett* **14** (2004) 2973- 2977.
- [48] Thoms, H. C.; Dunlop, M. G.; Stark, L. A. CDK4 inhibitors and apoptosis - A novel mechanism requiring nucleolar targeting of RelA. *Cell Cycle* **6** (2007) 1293-1297.
- [49] Hirai, H.; Kawanishi, N.; Iwasawa, Y. Recent advances in the development of selective small molecule inhibitors for cyclin-dependent kinases. *Curr Top Med Chem* **5** (2005) 167-179.
- [50] Baughn, L. B.; Di Liberto, M.; Wu, K.; Toogood, P. L.; Louie, T.; Gottschalk, R.; Niesvizky, R.; Cho, H.; Ely, S.; Moore, M. A. S.; Chen-Kiang, S. A novel orally active small molecule potently induces G(1) arrest in primary myeloma cells and prevents tumor growth by specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6. *Cancer Res* **66** (2006) 7661-7667.
- [51] Soni, R.; O'Reilly, T.; Furet, P.; Muller, L.; Stephan, C.; Zumstein-Mecker, S.; Fretz, H.; Fabbro, D.; Chaudhuri, B. Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *Journal of the National Cancer Institute* **93** (2001) 436-+.
- [52] Sharma, P. S.; Sharma, R.; Tyagi, R. Inhibitors of Cyclin Dependent kinases: Useful Targets for Cancer Treatment. *Curr Cancer Drug Targets* **8** (2008) 53-75.
- [53] Fischer, P. M. The use of CDK inhibitors in oncology - A pharmaceutical perspective. *Cell Cycle* **3** (2004) 742-746.
- [54] Lee, Y. M.; Sicinski, P. Targeting cyclins and cyclin-dependent kinases in cancer - Lessons from mice, hopes for therapeutic applications in human. *Cell Cycle* **5** (2006) 2110-2114.
- [55] Carlson, B. A.; Dubay, M. M.; Sausville, E. A.; Brizuela, L.; Worland, P. J. Flavopiridol induces G(1) arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK)2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* **56** (1996) 2973-2978.
- [56] Kaur, G.; Stetler-Stevenson, M.; Sebers, S.; Worland, P.; Sedlacek, H.; Myers, C.; Czeck, J.; Naik, R.; Sausville, E. Growth inhibition with reversible cell cycle

- arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *Nat Cancer Inst* **84** (1992) 1736-1740.
- [57] Akinaga, S.; Gomi, K.; Morimoto, M.; Tamaoki, T.; Okabe, M. Antitumor activity of UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C, in murine and human tumor models. *Cancer Res* **51** (1991) 4888-4892.
- [58] Kawakami, K.; Futami, H.; Takahara, J.; Yamaguchi, K. UCN-017-hydroxyl-staurosporine inhibits kinase activity of cyclin-dependent kinases and reduces phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in A549 human lung cancer cell line. *Biochem and Biophys Res Commun* **219** (1996) 778-793.
- [59] Ortega, S.; Prieto, I.; Odajima, J.; Martín, A.; Dubus, P.; Sotillo, R.; Barbero, J. L.; Malumbres, M.; Barbacid, M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* **35** (2003) 25-31.
- [60] Sherr, C. J.; Roberts, J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18** (2004) 2699-2711.
- [61] Liu, D.; Matzuk, M. M.; Sung, W. K.; Guo, Q. X.; Wang, P.; Wolgemuth, D. J. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* **20** (1998) 377-380.
- [62] Murphy, M.; Stinnakre, M. G.; Senamaud-Beaufort, C.; Winston, N. J.; Sweeney, C.; Kubelka, M.; Carrington, M.; Brechot, C.; Sobczak-Thepot, J. Delayed early embryoc lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* **15** (1997) 83-86.
- [63] Geng, Y.; Yu, Q. Y.; Sicinska, E.; Das, M.; Schneider, J. E.; Bhattacharya, S.; Rideout, W. M.; Bronson, R. T.; Gardner, H.; Sicinski, P. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* **114** (2003) 431-443.
- [64] Parisi, T.; Beck, A. R.; Rougier, N.; McNeil, T.; Lucian, L.; Werb, Z.; Amati, B. Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *Embo J* **22** (2003) 4794-4803.
- [65] Malumbres, M.; Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1** (2001) 222-231.
- [66] Kozar, K.; Ciemerych, M. A.; Rebel, V. I.; Shigematsu, H.; Zagozdon, A.; Sicinska, E.; Geng, Y.; You, Q.; Bhattacharya, S.; Bronson, R. T.; Akashi, K.; Sicinski, P. Mouse development an cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118** (2004) 477-491.
- [67] Malumbres, M.; Sotillo, R.; Santamaria, D.; Galan, J.; Cerezo, A.; Ortega, S.; Dubus, P.; Barbacid, M. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118** (2004) 493-504.
- [68] Malumbres, M.; Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *TIBS* **30** (2005) 630-641.
- [69] Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer:a changing paradigm. *Nature Rev Cancer* **9** (2009) 153-166.
- [70] Sherr, C. J.; Roberts, J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18** (2009) 2699-2711.
- [71] Frantz, S. Playing dirty. *Nature* **437** (2005) 942-943.
- [72] Tsutsui, T.; Hesabi, B.; Moons, D. S.; Pandolfi, P. P.; Hansel, K. S.; Koff, A.; Kiyokawa, H. Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27Kip1 activity. *Mol Cell Biol* **19** (1999) 7011-7019.
- [73] Shapiro, G. I.; Harper, J. W. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J.Clin.Inves.* **104** (2000) 1645-1653.
- [74] Steiner, M. S.; Zhang, Y.; Farooq, F.; Lerner, J.; Wang, Y.; Lu, Y. adenoviral vector containing wild type p16 suppresses prostata cancer growth and prolongs survival by inducing cell senescence. *Cancer Gene Therapy* **7** (2000) 360-372.
- [75] Jang, M.-Y.; Jonghe, S. D.; Gao, L.-J.; Rozenski, J.; Herdewijn, P. Development of Synthetic Strategies for the Construction of Pyrido[4,3-d]pyrimidine Libraries



- the Discovery of a New Class of PDE-4 Inhibitors. *European Journal of Organic Chemistry* (2006) 4257–4269.
- [76] Lu, H.; Schulze-Gahmen, U. Toward understanding the structural basis of cyclin-dependent kinase 6 specific inhibition. *J. Med. Chem.* **49** (2006) 3826-3831.
- [77] Phelps, M. E. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *PNAS* **97** (2000) 9226-9233.
- [78] Lieser, K. H. Einführung in die Kernchemie. *Verlag Chemie Weinheim* **2. Auflage** (1980).
- [79] Ache, H. J. Chemie des Positrons und Positroniums. *Angew Chemie* **84** (1972) 234-255.
- [80] Valk, P. E. Positron emission tomography: basic science and clinical practice. (2003).
- [81] Phelps, M. E.; Mazziotta, J.; Schelbert, H. Positron emission tomography and autoradiography. *Raven Press, New York* (1986).
- [82] McCarthy, T. J.; Schwarz, S. W.; Welch, M. J. Nuclear medicine and positron emission tomography: An overview. *J Chem Educ* **71** (1994) 830-836.
- [83] Fowler, J. S.; Wolf, A. P. Working against time: rapid radiotracer synthesis and imaging the human brain. *Acc Chem Res* **30** (1997) 181-188.
- [84] Lubberink, M.; Abdul Fatah, S.; Brans, B.; Hoekstra, O. S.; Teule, G. J. J. The role of <sup>124</sup>I-PET in diagnosis and treatment of thyroid carcinoma. *QJ Nucl Med Mol Imaging* **52** (2008) 30-36.
- [85] Gallagher, B. M.; Fowler, J. S.; Gutterson, N. I.; McGregor, R. R.; Wan, C. N.; Wolf, A. P. Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design : Some factors for the biodistribution of [<sup>18</sup>F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *J Nucl Med* **30** (1978).
- [86] Saha, G. B.; MacIntyre, W. J.; Go, R. T. Cyclotrons and Positronen emissions tomography radiopharmaceuticals for clinical imaging. *Semin Nucl Med* **22** (1992) 158-161.
- [87] Füchtner, F.; Preusche, S.; Mäding, P.; Zessin, J.; Steinbach, J. Factors affecting the specific activity of [<sup>18</sup>F]Fluorid from a [<sup>18</sup>O]water target. *Nuklearmedizin* **3** (2008) 116-119.
- [88] Coenen, H. H.; Mertens, J.; Mazière, B. Radioiodination reactions for pharmaceuticals - compendium for effective synthesis strategies, (2006).
- [89] Pentlow, K. S.; Graham, M. C.; Lambrecht, R. M.; Cheung, N. K. V.; Larson, S. M. Quantitativ imaging of I-124 using Positron Emission Tomography with Applications to Radioimmunodiagnosis and Radioimmunotherapy. *Med. Phys.* **18** (1991) 357-366.
- [90] van Dalen, J. A.; Visser, E. P.; Laverman, P.; Vogel, W. V.; Oyen, W. J. G.; Corstens, F. H. M.; Boerman, O. C. Effect of the positron range on the spatial resolution of a new generation pre-clinical PET using fluorine-18, gallium-68, zirconium-89 and iodine-124. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34** (2007) S228-S228.
- [91] Pentlow, K. S.; Graham, M. C.; Lambrecht, R. M.; Daghighian, F.; Bacharach, S. L.; Bendriem, B.; Finn, R. D.; Jordan, K.; Kalaigian, H.; Karp, J. S.; Robeson, W. R.; Larson, S. M. Quantitative imaging of iodine-124 with PET. *J Nucl Med* **37** (1996) 1557-1562.
- [92] Vandenberghe, S. Three-dimensional positron emission tomography imaging with <sup>124</sup>I and <sup>86</sup>Y. *Nucl Med Commun* **27** (2006) 237-245.
- [93] Qaim, S. M.; Vértes, A.; Nagy, S.; Klencsár, Z.; Rösch, F. Handbook of Nuclear Chemistry 4. **68** (2004).
- [94] Weinreich, R.; Knust, E. J. Quality assurance of iodine-124 produced via the nuclear reaction <sup>124</sup>Te(d,2n)<sup>124</sup>I. *J Radioanalyt Nucl Chem Lett* **213** (1996) 253-261.
- [95] Knust, E. J.; Dutschka, K.; Weinreich, R. *Appl Radiat Isot* **52** (2000) 181.

- [96] Hohn, A.; Nortier, F. M.; Scholten, B.; van der Walt, T. N.; Coenen, H. H.; Qaim, S. M. *Appl Radiat Isot* **55** (2001) 149.
- [97] Scholten, B.; Kovács, Z.; Tárkányi, F.; Qaim, S. M. excitation functions of  $^{124}\text{Te}(\text{p},\text{xn})^{124,123}\text{I}$  reactions from 6 to 31 MeV with special reference to the production of  $^{124}\text{I}$  at a small cyclotron. *Appl Radiat Isot* **46** (1995) 255-259.
- [98] Qaim, S. M.; Hohn, A.; Bastian, T.; El-Azoney, K. M.; Blessing, G.; Spellerberg, S.; Scholten, B.; Coenen, H. H. Some optimisation studies relevant to the production of high-purity  $^{124}\text{I}$  and  $^{120}\text{I}$  at a small-sized cyclotron. *Appl Radiat Isot* **58** (2003) 69-78.
- [99] Visser, G. W. M.; Bakker, C. N. M.; Herscheid, J. D. M.; Brinkman, G.; Hoekstra, A. The Chemical Properties of  $^{18}\text{F}$ Acetylhyopofluorite in Acetic Acid Solution. . *J Label Compd Radiopharm* **21** (1984) 1226.
- [100] Füchtner, F.; Steinbach, J. Efficient synthesis of the  $^{18}\text{F}$ -labelled 3-O-methyl-6- $^{18}\text{F}$ fluoro-L-DOPA. *Appl Radiat Isot* **58** (2003) 575-578.
- [101] Hess, E.; Sichler, S.; Kluge, A.; Coenen, H. H. Synthesis of 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-L-tyrosine via regiospecific fluoro-de-stannylation. *Appl Radiat Isot* **57** (2002) 185-191.
- [102] Namavari, M.; Bishop, A.; Satyamurthy, N.; Bida, G.; Barrio, J. R. Regioselective radiofluorodestannylation with  $^{18}\text{F}$  $\text{F}_2$  and  $^{18}\text{F}$  $\text{CH}_3\text{COOF}$ : A high yield synthesis of 6- $^{18}\text{F}$ fluoro-L-dopa. *Int J Rad Appl Instrum A* **43** (1992) 989-996.
- [103] Haka, M. S.; Kilbourn, M. R.; Watkins, G. L.; Toorongian, S. A. Aryltrimethylammonium Trifluoromethane-sulfonates as Precursors to Aryl  $^{18}\text{F}$ Fluorides: Improved Synthesis of  $^{18}\text{F}$ GBR-13119. *J Label Compd Radiopharm* **27** (1989) 823-833.
- [104] Block, D.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. The n.c.a. nucleophilic  $^{18}\text{F}$ -Fluorination of 1,N-disubstituted alkanes as fluoroalkylation agents. *J Label Compd Radiopharm* **24** (1987) 1029-1042.
- [105] Block, D.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. N.c.a.  $^{18}\text{F}$ -Fluoralkylation of H-Acidic Compounds. *J Label Compd Radiopharm* **25** (1988) 201-216.
- [106] Block, D.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G.  $^{18}\text{F}$ -Fluoracylation via Fluorocarboxylic Acid esters. . *J Label Compd Radiopharm* **25** (1988) 185-200.
- [107] Kilbourn, M. R.; Dence, C. S.; Welch, M. J.; Mathias, C. J. Fluorine-18 labeling of proteins. *J. Nucl. Med.* **28** (1987) 462-470.
- [108] Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R. Labeling proteins with fluorine-18 using N-succinimidyl 4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzoate. *Nucl Med Biol* **19** (1992) 275-281.
- [109] Wester, H.; Hamacher, K.; Stocklin, G. A comparative study of NCA fluorine-18 labeling of proteins via acylation and photochemical conjugation. *Nucl. Med. Biol.* **23** (1996) 365-372.
- [110] Guhlke, S.; Wester, H. J.; Bruns, C.; Stöcklin, G. 2- $^{18}\text{F}$ Fluoropropionyl(D)phe1)-octreotide, a potential radiopharmaceutical for quantitative somatostatin receptor imaging with PET: Synthesis, Radiolabelling, In-vitro-validation and biodistribution in mice. *Nucl Med Biol* **23** (1996) 365-372.
- [111] Shai, Y.; Kirk, K. L.; Channing, M. A.; Dunn, B. B.; Lesniak, M. A.; Eastman, R. C.; Finn, R. D.; Roth, J.; Jacobson, K. A.  $^{18}\text{F}$ -Labeled Insulin: A Prosthetic Group Methodology for Incorporation of a Positron Emitter into Peptides and Proteins. *Biochem* **28** (1989) 4801-4806.
- [112] Lu, S.-Y.; Chin, F. T.; McCarron, J. A.; Pike, V. W. Efficient O- and N-(beta-fluorethyl)ations with nca  $^{18}\text{F}$ beta-fluorethyl tosylate under microwave-enhanced conditions. *J Label Compd Radiopharm* **47** (2004) 289-297.
- [113] Chi, D. Y.; Kiesewetter, D. O.; Katzenellenbogen, J. A.; Kilbourn, M. R.; Welch, M. J. Halofluorination of olefins: elucidation of reaction characteristics and application in labelling with the positron emitting radionuclide fluorine-18. *J Fluorine Chem* **31** (1986) 99-113.

- [114] Wester, H. J.; Herz, M.; Weber, W.; Heiss, P.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Schwaiger, M.; Stocklin, G. Synthesis and radiopharmacology of O-(2-[F-18]fluoroethyl)-L-tyrosine for tumor imaging. *J Med Chem* **40** (1999) 205-212.
- [115] Wadsak, W.; Mien, L. K.; Ettlinger, D. E.; Eidherr, H.; Haeusler, D.; Sindelar, K. M.; Keppler, B. K.; Dudczak, R.; Kletter, K.; Mitterhauser, M. F-18 fluoroethylations: different strategies for the rapid translation of C-11-methylated radiotracers. *Nucl Med Biol* **34** (2007) 1019-1028.
- [116] Elsinga, P. H.; Kawamura, K.; Kobayashi, T.; Tsukada, H.; Senda, M.; Vaalburg, W.; Ishiwata, K. Synthesis and evaluation of [18F]fluoroethyl SA4503 as a PET ligand for the sigma receptor. *Synapse* **43** (2002) 259-267.
- [117] Satyamurthy, N.; Bida, G. T.; Barrio, J. R.; Luxen, A.; Mazziotta, J. C.; Huang, S. C.; Phelps, M. E. No-carrier-added 3-(2'-[F-18]fluoroethyl)piperone, a new dopamine receptor-binding tracer for positron emission tomography. *Nucl Med Biol* **13** (1986) 617-624.
- [118] Bergman, J.; Eskola, O.; Lehtikoinen, P.; Solin, O. Automated synthesis and purification of [F-18]bromofluoromethane at high specific radioactivity. *Appl Radiat Isot* **54** (2001) 927-933.
- [119] Zessin, J.; Eskola, O.; Brust, P.; Bergman, J.; Steinbach, J.; Lehtikoinen, P.; Solin, O.; Johannsen, B. Synthesis of S-([F-18]fluoromethyl)-(+)-McN5652 as a potential PET radioligand for the serotonin transporter. *Nucl Med Biol* **28** (2001) 857-863.
- [120] Skaddan, M. B.; Kilbourn, M. R.; Snyder, S. E.; Sherman, P. S.; Desmond, T. J.; Frey, K. A. Synthesis, F-18-labeling, and biological evaluation of piperidyl and pyrrolidyl benzilates as in vivo ligands for muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* **43** (2000) 4552-4562.
- [121] Chi, D. Y.; Kilbourn, M. R.; Katzenellenbogen, J. A.; Brodack, J. W.; Welch, M. J. Synthesis of no-carrier-added N([18F]fluoroalkyl)piperone derivatives. *Appl Radiat Isot* **37** (1986) 1137-1180.
- [122] Coenen, H. H.; Colosimo, M.; Schüller, M.; Stöcklin, G. Comparison of [18F]fluoropropylating agents for 18F labeling of amines. *J Label Compd Radiopharm* **28** (1986) 587.
- [123] Chesis, P. L.; Welch, M. J. Comparison of Bromo- and Iodoalkyl triflates for 18F-Radiolabeling of amines. *Appl Radiat Isot* **41** (1990) 259-265.
- [124] Zijlstra, S.; De Groot, T. J.; Kok, L. P.; Visser, G. M.; Vaalburg, W. N-[18F]-fluoroalkylation of noraporphines: microwave versus thermal treatment. *Eur J Morphol* **33** (1995) 154-157.
- [125] Weber, W.; Wester, H. J.; Grose, A. L.; Herz, M.; Dzewas, B.; Feldmann, H. J.; Molls, M.; Stocklin, G.; Schwaiger, M. O-(2-[F-18]fluoroethyl)-L-tyrosine and L-[methyl-C-11]methionine uptake in brain tumours: initial results of a comparative study. *Eur J Nucl Med* **27** (2000) 542-549.
- [126] Chaly, T.; Dhawan, V.; Kazumata, K.; Antonini, A.; Margouleff, C.; Dahl, J. R.; Belakhlef, A.; Margouleff, D.; Yee, A.; Wang, S. Y.; Tamagnan, G.; Neumeyer, J. L.; Eidelberg, D. Radiosynthesis of [F-18] N-3-fluoropropyl-2-beta-carbomethoxy-3-beta-(4-iodophenyl) nortropane and the first human study with positron emission tomography. *Nucl Med Biol* **23** (1996) 999-1004.
- [127] Kazumata, K.; Dhawan, V.; Chaly, T.; Antonini, A.; Margouleff, C.; Belakhlef, A.; Neumeyer, J.; Eidelberg, D. Dopamine transporter imaging with fluorine-18-FPCIT and PET. *J Nucl Med* **39** (1998) 1521-1530.
- [128] Gester, S.; Pietzsch, J.; Wuest, F. Synthesis of F-18-labelled stilbenes from 4-(F-18)fluorobenzaldehyde using the Horner-Wadsworth-Emmons reaction. *J Label Compd Radiopharm* **50** (2007) 105-113.
- [129] Wuest, F.; Kniess, T. Synthesis of 4-[18F]fluoroiodobenzene and its application in sonogashira cross-coupling reactions. *J Label Compd Radiopharm* **46** (2003) 699-713.

- [130] Steiniger, B.; Wuest, F. Synthesis of F-18-labelled biphenyls via SUZUKI cross-coupling with 4-[F-18]fluoriodobenzene. *J Label Compd Radiopharm* **49** (2006) 817-827.
- [131] Ludwig, T.; Gail, R.; Coenen, H. H. N.c.a. 18F-Fluoroarylation via Organometallic Intermediates. *J Nucl Med* **39** (1998) 21P.
- [132] Seevers, R. H.; Counsell, R. E. Radioiodination techniques for small organic-molecules. *Chemical reviews* **82** (1982) 575-590.
- [133] Moerlein, S. M.; Coenen, H. H. Regiospecific No-Carrier-Added Radiobromination and Radioiodination of Aryltrimethyl Group IVb Organometallics. *J Chem Soc Perkin Trans 1* (1985) 1941-1947.
- [134] Kabalka, G. W.; Varma, R. S. The synthesis of radiolabeled compounds via organometallic intermediates. *Tetrahedron* **45** (1989) 6601-6621.
- [135] Eisenhut, M.; Mier, W. Radioiodination chemistry and radioiodinated compounds in: Handbook of nuclear chemistry Vol. 4 (Eds., Vertes, A.; Nagy, S.; Klencsar, Z.) Kluwer Academic Publ, Amsterdam (The Netherlands) (2003) 257-278.
- [136] Hunter, W. M.; Greenwood, F. C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194** (2002) 495-496.
- [137] Markwell, M. A. K. A new solid state reagent to iodinate proteins. I. Conditions for the efficient labeling of antiserum. *Anal Biochem* **125** (1982) 427-432.
- [138] Fraker, P. I.; Speck, J. C. J. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-3a,4a-diphenylglycouril. *Biochem Biophys Res Com* **80** (1978) 849-856.
- [139] Ünak, T.; Akgün, Z.; Yildirim, Y.; Duman, Y.; Erenel, G. Self-radioiodination of iodogen. *Appl. Radiat. Isot.* **54** (2001) 749-752.
- [140] Liefhold, J.; Eisenhut, M. Synthesis, labeling, and pharmacokinetics of I-131-labeled phenylene-iodophenyl-fatty acids (PHIPA). *J. Label. Compd. Radiopharm.* **23** (1986) 1239.
- [141] Moerlein, S. M. Regiospecific aromatic radioiodination via no-carrier-added copper(I) chlorid-assisted iododebromination. *Radiochim. Acta* **50** (1990) 55-61.
- [142] Graf, F. *Dissertation TU Dresden* (in Vorbereitung) angefertigt am FZD, Institut für Radiopharmazie.
- [143] Horner, L.; Hoffmann, H.; Wippel, H. G. Phosphororganische Verbindungen, XII. Phosphinoxyde als Olefinierungsreagenzien. *Chem Ber* **91** (1958) 61-63.
- [144] Brückner, R. Reaktionsmechanismen (organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden). *Spektrum Akademischer Verlag Heidelber, Berlin 2., aktualisierte und erweiterte Auflage* (2003).
- [145] Horner, L.; Hoffmann, H.; Wippel, H. G.; Klahre, G. Phosphororganische Verbindungen, XX. Phosphinoxyde als Olefinierungsreagenzien. *Chem Ber* **92** (1959) 2499-2505.
- [146] Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. The utility of phosphonate carbanions in olefin synthesis. *J Am Chem Soc* **83** (1961) 1733-1738.
- [147] Wadsworth, W. S. Synthetic applications of phosphoryl-stabilized anions. *Org Reactions* **25** (1977) 73-253.
- [148] Takeda, T. Modern carbonyl olefination - methods and applications. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* (2004).
- [149] Wittig, G.; Rieber, M. Darstellung und Eigenschaften des Pentaphenyl-phosphors. *Liebigs Ann Chem* **562** (1949) 187-192.
- [150] Wittig, G.; Geissler, G. Zur Reaktionsweise des Pentaphenyl-phosphors und einiger Derivate. *Liebigs Ann Chem* **580** (1953) 44-57.
- [151] Merkushev, E. B.; Simakhina, N. D.; Kovesnikova, G. M. A new, convenient iodination method of aromatic compounds. *Synthesis* (1980) 486-487.
- [152] D'Auria, M.; Mauriello, G. Bis-(trifluoroacetoxy)iodobenzen - iodine system: an efficient and selective reagent for iodination of thiophene derivatives. *Tetrahedron Lett* **36** (1995) 4883-4884.

- [153] Benhida, R.; Blanchard, P.; Rourrey, J.-L. A mild and effective iodination method using iodine in the presence of bis-(trifluoroacetoxy)iodobenzene. *Tetrahedron Lett* **39** (1998) 6849-6852.
- [154] Becker, H. G. O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Habicher, W. D.; Metz, W. D.; Pavel, D.; Schwetlick, K. Organikum - organisch Chemisches Grundpraktikum. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* **21** (2001).
- [155] Heiermann, J. Palladiumkatalysierte Dominoarylierung substituierter und anellierter Cyclopentadiene - Eine neue Synthesemethode für Pentaarylcyclopentadiene. *Dissertation, Fachbereiches 6 (Chemie-Geographie), Gerhard-Mercator-Universität Gesamthochschule Duisburg* (2000).
- [156] Uchil, V.; Seo, B.; Nair, V. A novel strategy to assemble the beta-diketo acid pharmacophore of HIV integrase inhibitors on purine nucleobase scaffolds. *J Org Chem* **72** (2007) 8577-8579.
- [157] Beaver, K. A.; Siegmund, A. C.; Spear, K. L. Application of the Sulfonamide functional group as an anchor for solid phase organic synthesis (SPOS). *Tetrahedron Lett* **37** (1996) 1145-1148.
- [158] Schweder, B.; Uhlig, E.; Döring, M.; Kosemund, D. delta16-20-ketosteroide durch C2-Verlängerung aus delta16-17-substituierten Steroiden. *J prakt Chem* **335** (1992) 439-444.
- [159] Clark, H. C.; O'Brien, R. J.; Trotter, J. Crystal structure of trimethyltin fluoride. *Proc Chem Soc London* (1963) 85.
- [160] Leibner, J. E.; Jacobus, J. Facile Product isolation from Organostannane reduction of Organic Halides. *J Org Chem* **44** (1979) 449.
- [161] Davis, F. A.; Sheppard, A. C. Applications of oxaziridines in organic chemistry. *Tetrahedron Lett* **45** (1989) 5703-5742.
- [162] Davis, F. A.; Chattopadhyay, S.; Towson, J. C.; Lal, S.; Reddy, T. Chemistry of Oxaziridines. 9. Synthesis of 2-Sulfonyl- and 2-Sulfamoyloxaziridines Using Potassium Peroxymonosulfate (Oxone). *J Org Chem* **53** (1988) 2087-2089.
- [163] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. *Georg Thieme Verlag* **6., überarbeitete Auflage** (2002).
- [164] Piel, M.; Schirrmacher, R.; Höhnemann, S.; Hamkens, W.; Kohl, B.; Jansen, M.; Schmitt, U.; Lüddens, H.; Dannhardt, G.; Rösch, F. Synthesis and evaluation of 5,7-dichloro-4-(3-{4-[4-(2-[18F]fluoroethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-2-carboxylic acid as a potential NMDA ligand to study glutamatergic neurotransmission in vivo. *J Label Compd Radiopharm* **46** (2003) 645-659.
- [165] Ram, S.; Ehrenkauf, R. E. Ammonium formate in organic synthesis: a versatile agent in catalytic hydrogen transfer reductions. *Synthesis* (1988) 91-96.
- [166] Bartek, J.; Vojtesek, B.; Grand, R. J. A.; Gallimore, P. H.; Lane, D. P. Cellular localization and T antigen binding of the retinoblastoma protein. *Oncogene* **7** (1992) 101-108.
- [167] Liggett, W. H. J.; Sewell, D. A.; Rocco, J.; Ahrendt, S. A.; Koch, W.; Sidransky, D. p16 and p16 $\beta$  are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* **56** (1996) 4119-4123.
- [168] Graf, F.; Koehler, L.; Kniess, T.; Wuest, F.; Mosch, B.; Pietzsch, J. Cell cycle regulation kinase Cdk4 as a potential target for tumor cell treatment and tumor imaging. *J Oncol Article ID* **106378** (2009) 1-12
- [169] Bohme, D. K.; RAKSIT, A. B. Gas-phase measurements of the influence of stepwise solvation on the kinetics of S<sub>N</sub>2 reactions of solvated F<sup>-</sup> with CH<sub>3</sub>Cl and CH<sub>3</sub>Br and of solvated Cl<sup>-</sup> with CH<sub>3</sub>Br. *Can J Chem* **63** (1985).
- [170] Coenen, H. H.; Klatte, B.; Knöchel, A.; Schüller, M.; Stöcklin, G. Preparation of nca [17-<sup>18</sup>F]-Fluoroheptadecanoic acid in high yield via aminopolyether

- supported, nucleophilic fluorination. *J Label Compd Radiopharm* **23** (1986) 455-466.
- [171] Wang, K.; Adelstein, S. J.; Kassis, A. I. DMSO increases radioiodination yield of radiopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot* **66** (2008) 50-59.
- [172] Große-Gehling, P. Synthese und Charakterisierung von Markierungsvorstufen und Referenzverbindungen sowie Fluoralkylierung mit dem kurzlebigen Positronenstrahler Fluor-18. *Diplomarbeit, Hochschule für Technik und Wirtschaft, Dresden* (2008) angefertigt am FZD, Institut für Radiopharmazie.
- [173] Comagic, S.; Piel, M.; Schirmacher, R.; Höhnemann, S.; Rösch, F. Efficient synthesis of 2-bromo-1-[<sup>18</sup>F]fluoroethanol and its application in the automated preparation of <sup>18</sup>F-fluoroethylated compounds. *Appl Radiat Isot* **56** (2002) 847-851.
- [174] Wilson, A. A.; Dannals, R. F.; Ravert, H. T.; Wagner, J., H.N. Reductive amination of [<sup>18</sup>F]fluorobenzaldehydes - radiosynthesis of 2-[<sup>18</sup>F]fluorodexetimides and 4-[<sup>18</sup>F]fluorodexetimides. *J. Label. Compds.* **28** (1990) 1189-1199.
- [175] Prenant, C.; Gillies, K.; Bailey, J.; Chimon, G.; Smith, N.; Jayson, G. C.; Zweit, J. Synthesis of [<sup>18</sup>F]fluoroacetaldehyde. Application to [<sup>18</sup>F]fluoroethylation of benzylamine under reductive alkylation conditions. *J Label Compd Radiopharm* **51** (2008) 262-267.
- [176] Veach, D. R.; Namavari, M.; Pillarsetty, N.; Santos, E. B.; Beresten-Kochetkov, T.; Lambek, C.; Punzalan, B. J.; Antczak, C.; Smith-Jones, P. M.; Djaballah, H.; Clarkson, B.; Larson, S. M. Synthesis and Biological Evaluation of a Fluorine-18 Derivative of Dasatinib. *J Med Chem* **50** (2007) 5853-5857.
- [177] Zhang, M.-R.; Furutsuka, K.; Yoshida, Y.; Suzuki, K. How to increase the reactivity of [<sup>18</sup>F]fluoroethyl bromide: [<sup>18</sup>F]fluoroethylation of amine, phenol and amide functional groups with [<sup>18</sup>F]FETBr, [<sup>18</sup>F]FETBr/Nal and [<sup>18</sup>F]FETf. *J Label Compd Radiopharm* **46** (2003) 587-598.
- [178] Gohlke, S.; Schmaljohann, J.; Kuerpig, S.; Biersack, H. A new versatile <sup>18</sup>F-fluoroethylation method based on solid phase extraction (SPE) of <sup>18</sup>F-fluoroethylbromide (FEB). *J Nucl Med* **49 Suppl 1** (2008) 302P.
- [179] Zhang, M.-R.; Suzuki, K. [<sup>18</sup>F]Fluoroalkyl Agents: Synthesis, Reactivity and Application for Development of PET Ligands in Molecular Imaging. *Curr Top Med Chem* **7** (2007) 1817-1828.
- [180] Baumann, A.; Piel, M.; Schirmacher, R.; Rösch, F. Efficient alkali iodide promoted <sup>18</sup>F-fluoroethylations with 2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl tosylate and 1-bromo-2-[<sup>18</sup>F]fluoroethanol. *Tetrahedron Lett* **44** (2003) 9165-9167.
- [181] Wagner, S.; Breyholz, H. J.; Schaefer, M.; Schober, O.; Kopka, K. <sup>18</sup>F-labeled pyrimidine-2,4,6-triones as potential probes for imaging activated MMPs. *J Label Compd Radiopharm* **52** (2009) S40.
- [182] Binder, H. Lexikon der chemischen Elemente. *Stuttgart/Leipzig* (1999).
- [183] Trueb, L. F. Die chemischen Elemente. *Stuttgart* (2005).
- [184] Wuest, F.; Hultsch, C.; Bergmann, R.; Johannsen, B.; Henle, T. Radiolabelling of isopeptide Ne-(g-glutamyl)-l-lysine by conjugation with N-succinimidyl-4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzoate. *Appl Radiat Isot* **59** (2003) 43-48.
- [185] Hansch, C.; Lien, E. J.; Helmer, F. Structure-activity correlations in metabolism of drugs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **128** (1968) 319-330.
- [186] Helmer, F.; Kiehs, K.; Hansch, C. Linear free-energy relationship between partition coefficients and binding and conformational perturbation of macromolecules by small organic compounds. *Biochemistry* **7** (1968) 2858-2863.
- [187] Testa, B.; Carrupt, P. A.; Gaillard, P.; Billois, F.; Weber, P. Lipophilicity in molecular modeling. *Pharmaceutical Research* **13** (1996) 335-343.

- [188] Hansch, C.; Kiehs, K.; Lawrence, G. L. J. A. c. S., 5770; (1965). The role of substituents in the hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins. *J Am Chem Soc* **87** (1965) 5770.
- [189] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **46** (2001) 3-26.
- [190] Eckelman, W. C. The Use of In Vitro Models to Predict the Distribution of Receptor Binding Radiotracers In Vivo. *Nucl Med Biol Int J Radiat Appl Instrum Part B* **16** (1989) 233-245.
- [191] Wilson, A. A.; Jin, L.; Garcia, A.; DaSilva, J. N.; Houle, S. An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Appl Radiat Isot* **54** (2001) 203-208.
- [192] Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. Synthese von <sup>11</sup>C-, <sup>18</sup>F-, <sup>15</sup>O- und <sup>13</sup>N-Radiotracern für die Positronenemissionstomographie. *Angew Chemie* **120** (2008).
- [193] Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolman, J. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme Verlag* **14., neubearbeitete Auflage** (1994).
- [194] Marschner, K. Multizelluläre Tumorsphäroide als Modellsystem für Mikrometastasen: Metabolische Charakterisierung mittels Radiotracer-Aufnahme und Untersuchungen zum proangiogenen Faktor VEGF. *Diplomarbeit, Technische Universität Dresden* (2007).
- [195] Magata, Y.; Lang, L.; Kiesewetter, D. O.; Jagoda, E. M.; Channing, M. A.; Eckelman, W. C. Biologically Stable [<sup>18</sup>F]-labeled Benzylfluoride Derivatives. *Nucl Med Biol* **27** (2000) 163-168.
- [196] Brust, P.; Haubner, R.; Friedrich, A.; Scheunemann, M.; Anton, M.; Koufaki, O. N.; Hauses, M.; Noll, S.; Noll, B.; Haberkorn, U.; Schackert, G.; Schackert, H. K.; Avril, N.; Johannsen, B. Comparison of F-18 FHPG and I-124/125 FIAU for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression. *European Journal of Nuclear Medicine* **28** (2001) 721-729.
- [197] Tjuvajev, J. G.; Avril, N.; Oku, T.; Sasajima, T.; Miyagawa, T.; Joshi, R.; Safer, M.; Beattie, B.; DiResta, G.; Daghighian, F.; Augensen, F.; Koutcher, J.; Zweit, J.; Humm, J.; Larson, S. M.; Finn, R.; Blasberg, R. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. *Cancer Research* **58** (1998) 4333-4341.
- [198] Kim, S. W.; Park, J. H.; Yang, S. D.; Hur, M. G.; Choi, C. W.; Yu, K. R. Synthesis and in vitro/vivo Evaluation of Iodine-123/124 Labelled Hypericin Derivatives. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **29** (2008) 2023-2025.
- [199] Pal, A.; Glekas, A.; Doubrovin, M.; Balatoni, J.; Beresten, T.; Maxwell, D.; Soghomonyan, S.; Shavrin, A.; Ageyeva, L.; Finn, R.; Larson, S. M.; Bornmann, W.; Gelovani, J. G. Molecular imaging of EGFR kinase activity in tumors with I-124-labeled small molecular tracer and positron emission tomography. *Molecular Imaging and Biology* **8** (2006) 262-277.
- [200] Zanzonico, P.; O'Donoghue, J.; Chapman, J. D.; Schneider, R.; Cai, S.; Larson, S. D.; Wen, B. X.; Chen, Y. C.; Finn, R.; Ruan, S. T.; Gerweck, L.; Humm, J.; Ling, C. Iodine-124-labeled iodo-azomycin-galactoside imaging of tumor hypoxia in mice with serial microPET scanning. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **31** (2004) 117-128.
- [201] Zanzonico, P. B.; Chapman, J. D.; Schneider, R. F.; Shangde, C.; Chen, Y.; Finn, R.; Ruan, S.; Humm, J. L.; Larson, S. M.; Ling, C. Radiation dosimetry of iodine-124-labeled iodo-azomycin galacto-pyranoside (I124-IAZGP), a new hypoxia PET tracer. *Journal of Nuclear Medicine* **44** (2003) 1153.
- [202] Blasberg, R. G.; Roelcke, U.; Weinreich, R.; Beattie, B.; von Ammon, K.; Yonekawa, Y.; Landolt, H.; Guenther, I.; Crompton, N. E. A.; Vontobel, P.;

- Missimer, J.; Maguire, R. P.; Koziorowski, J.; Knust, E. J.; Finn, R. D.; Leenders, K. L. Imaging brain tumor proliferative activity with I-124 iododeoxyuridine. *Cancer Research* **60** (2000) 624-635.
- [203] Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem* **43** (1978) 2923-2925.



## 8. Anhang

### A Verwendete Abkürzungen

[ <sup>18</sup> F]BFE	1-[ <sup>18</sup> F]Brom-2-fluorethan
%ID	Prozent injizierte Dosis
[ <sup>18</sup> F]FDG	2-[ <sup>18</sup> F]Fluordesoxyglukose
[ <sup>18</sup> F]FETf	1-[ <sup>18</sup> F]Fluor-2-ethyltriflat
[ <sup>18</sup> F]FETos	1-[ <sup>18</sup> F]Fluor-2-ethyltosylat
[ <sup>18</sup> F]IFE	1-[ <sup>18</sup> F]Fluor-2-iodethan
[ <sup>18</sup> F]SFB	N-Succinimidyl-4-[ <sup>18</sup> F]fluorbenzoat
A	Nukleonenzahl
APC	<i>anaphase promoting complex</i>
BSA	Rinderserum Albumin
c.a.	<i>carrier added</i> - geträgert
c.f.	<i>carrier free</i> - trägerfrei
CAT	Chloramin T
Cdk	Cyklinabhängige Kinase
Cip	<i>Cdk inhibitory polypeptides</i>
Cki	Inhibitor der Cdk
cSRC	<i>proto-oncogenic tyrosine kinase</i>
CT	Computertomographie
Cyk	Cyklin
d	Deuteron
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e <sup>-</sup>	Elektron
EC	<i>electron capture</i> - Elektroneneinfang
EGFr	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ESI	Elektronspray Ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FGFr	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
i.v.	intravenös

Ink4	<i>inhibitors of Cdk4</i>
LM	Lösungsmittel
logD <sub>7,4</sub>	Lipophilie bei einem pH-Wert von 7,4
LOR	<i>line of response</i>
M	Metall
Me	Methyl
MEF	<i>mouse embryo fibroblast</i>
MPF	<i>m-phase promoting factor</i>
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MS	Massenspektrometrie
MV	Markierungsvorstufe
n.c.a.	<i>no carrier added</i> - ohne Trägerzusatz
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholinoxid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NP	Nebenprodukt
p	Proton
<b>p[<sup>18</sup>F]F-SA</b>	4-[ <sup>18</sup> F]Fluor- <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(prop-2-ynyl)benzolsulfonamid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGFr	<i>Platelet derived growth factor Receptor</i>
PET	PET Positronen-Emissions-Tomographie
pRB	Retinoblastom-Protein
Pre-RC	<i>prereplication Complex</i>
RCA	Radiochemische Ausbeute
RCR	Radiochemische Reinheit
rel.E.	relative Einheiten
Rf	Retentionsfaktor
RP-18	C-18 Umkehrphase
Rt	Retentionszeit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> -Natriumdodecylsulfat
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Computer-Tomographie
SUV	<i>Standard uptake value</i>
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Z	Kernladungszahl

## B Optimierung der Fluorethylierung

**Tabelle 27: Optimierung zur Darstellung von [<sup>18</sup>F]CKIE.** Der Anteil an Edukt spiegelt freies [<sup>18</sup>F]BFE und [<sup>18</sup>F]IFE wider

LM	Temp [°C]	Iodid	Base	Anteil Produkt [%]	Anteil Edukt [%]	Anteil NP1 [%]
MeCN	90	NaI	NaH	0	33	13
MeCN	90		NaH	0	15	3
MeCN	90	NaI	KO <sup>t</sup> bu	0	39	10
MeCN	90		KO <sup>t</sup> bu	0	25	5
MeCN	90	NaI	TBAH	1	33	9
MeCN	90		TBAH	9	14	6
MeCN	90			0	75	20
MeCN	90	NaI		5	83	3
DMF	90	NaI	NaH	0	9	32
DMF	90		NaH	0	41	14
DMF	90	NaI	KO <sup>t</sup> bu	1	47	11
DMF	90		KO <sup>t</sup> bu	0	56	10
DMF	90	NaI	TBAH	0	48	23
DMF	90		TBAH	0	30	20
DMF	90	NaI		2	41-85	51-10
DMF	90			0	40-78	60-15
DMSO	90			0	23	65
DMSO	90	NaI		0	49	44
MeOH	100		NaOH	4	9	5
MeOH	100	NaI	NaOH	22	53	4
MeOH	100		TBAH	0	4	1
MeCN	130	NaI	NaH	4-7	0-46	21-32
MeCN	130		NaH	18-22	0-4	0-6
MeCN	130	NaI	KO <sup>t</sup> bu	3-12	15-60	5-18
MeCN	130		KO <sup>t</sup> bu	15-22	5-8	2-3
MeCN	130	NaI	TBAH	4	0	0
MeCN	130		TBAH	3	0	0
MeCN	130			0	7	86
MeCN	130	NaI		5	53	27
DMF	130	NaI	NaH	0	0	87
DMF	130		NaH	0	0	76
DMF	130	NaI	KO <sup>t</sup> bu	9	0	40
DMF	130		KO <sup>t</sup> bu	8	0	45
DMF	130	NaI	TBAH	2	0	63
DMF	130		TBAH	0	0	56
DMF	130	NaI		0	7-18	46-61
DMF	130			0-1	0-3	88-94
DMF	130		NaOH	33	46	13
DMF	130	NaI	NaOH	38	40	10
DMSO	130			3	1	66
DMSO	130	NaI		1,2	7	58
Sulfolan	130	NaI	NaH	0	0	12
Sulfolan	130		NaH	5	0	21
Sulfolan	130	NaI	KO <sup>t</sup> bu	26	42	18
Sulfolan	130		KO <sup>t</sup> bu	55	3	24
Sulfolan	130	NaI	TBAH	6	0	6
Sulfolan	130		TBAH	40	0	14

## C Abbildungsverzeichniss

Abbildung 1: Schematischer Ablauf des Zellzyklus.....	2
Abbildung 2: Schematische Abbildung eines Cdk/Cyk-Komplexes .....	4
Abbildung 3: Model der Regulation des eukaryotischen Zellzyklus.....	4
Abbildung 4: Regulation der Rb und E2F Aktivität in der späten G <sub>1</sub> -Phase.....	6
Abbildung 5: Strukturformel des Staurosporins.....	8
Abbildung 6: Flavopiridol (A) und natürlich vorkommende Derivate Genistein (B) und Quercitin (C).....	9
Abbildung 7: Strukturformel von UCN-01 und BMS-387032 [45, 54-57]. .....	10
Abbildung 8: Genetische Untersuchung der Rolle der Cdks in Zellen von Säugetieren [68].....	12
Abbildung 9: Leitstruktur der Derivate für die Cdk4/6 Inhibitor-Entwicklung .....	14
Abbildung 10: Verbindung D [8].....	14
Abbildung 11: Grundgerüst der Pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-Derivate und Substituenten für Rest R [8].....	15
Abbildung 12: Strukturformel von PD 0183812 und PD 0332991, Oberflächendarstellung des gebundenen Inhibitor in der Bindungstasche des Cdk6-Moleküls [9, 10, 75] .....	16
Abbildung 13: Grundgerüst der Pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-Derivate .....	17
Abbildung 14: George de Hevesy – „Vater der Nuklearmedizin“ (1885 - 1966).....	18
Abbildung 15: Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie. ....	20
Abbildung 16: Strukturformel des [ <sup>18</sup> F]FDG .....	21
Abbildung 17: Prosthetische Gruppen für die Fluoralkylierung .....	25
Abbildung 18: Ausgewählte prosthetische Gruppen für die Fluorarylierung. ....	25
Abbildung 19: Mechanismus der elektrophilen Substitution am Aromat [87].....	26
Abbildung 20: Strukturformeln von Chloramin T (links) und Iodogen™ (rechts).....	28
Abbildung 21: Darzustellende mögliche Inhibitoren und Markierungsvorstufen .....	31
Abbildung 22: Leitstruktur der Derivate für die Cdk4/6 Inhibitor-Entwicklung .....	32
Abbildung 23: Direkter Vergleich der IC <sub>50</sub> -Werte einer unsubstituierten Verbindung N mit einer an der Seitenkette hydroxyethylierten Verbindung M [13].....	33
Abbildung 24: Genereller Syntheseweg zur Darstellung der Grundgerüste 19 und 20.....	35
Abbildung 25: Syntheschema der Seitenketten .....	35
Abbildung 26: Kupplung der Seitenketten an die Grundgerüste .....	36
Abbildung 27: Darstellung von 11 .....	36
Abbildung 28: Darstellung von 12.....	37
Abbildung 29: Darstellung von 13.....	38
Abbildung 30: Darstellung von 14.....	38
Abbildung 31: Mechanismus der Grignardreaktion zur Umsetzung von 13 zu 14 .....	39
Abbildung 32: Darstellung von 15.....	39
Abbildung 33: Darstellung von 16.....	40
Abbildung 34: Bildung von 16 nach der Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion Bindungen.....	40
Abbildung 35: Ausschnitt des NMR-Spektrums der Verbindung 16 .....	42
Abbildung 36: Darstellung von 17.....	43
Abbildung 37: Mechanismus der Iodierung mit Bis(trifluoracetoxy)iodbenzol.....	43
Abbildung 38: Darstellung von 18.....	44
Abbildung 39: Bildung von 18 in einer Stille Kupplung.....	44
Abbildung 40: Umlagerung des Ethoxyvinylethers zur Verbindung 18.....	45
Abbildung 41: <i>In situ</i> -Reduktion des Palladium(II)-Komplexes zu Pd(0) .....	46
Abbildung 42: Ausschnitt der <sup>1</sup> H-NMR-Spektren der Verbindungen 17 (links) und 18 (rechts) .....	47
Abbildung 43: Darstellung von 19 und 20 .....	48

Abbildung 44: allgemeiner Mechanismus der Oxidation eines Thioethers mit dem Oxaziridin 27 .....	48
Abbildung 45: Darstellung von Verbindung 1 .....	49
Abbildung 46: Darstellung der Verbindung 3 .....	50
Abbildung 47: Ausschnitt des <sup>1</sup> H-NMR Spektrums der Verbindung 3 (Pyridinringsignale) .....	51
Abbildung 48: Ausschnitt des <sup>1</sup> H-NMR Spektrums der Verbindung 3 (Piperazinringsignale).....	51
Abbildung 49: Darstellung von 5 und 6 .....	52
Abbildung 50: Ausschnitte des <sup>1</sup> H-NMR-Spektrums von 6 (Fluorethylgruppe).....	53
Abbildung 51: <sup>19</sup> F-NMR-Spektrum der Verbindung 6. ....	53
Abbildung 52: Reduktion der Nitrogruppe zum primären Amin .....	54
Abbildung 53: Kupplung der Seitenketten an die Grundgerüste .....	55
Abbildung 54: Schema der 2:1-Addukte nach Toogood et al., 2005 [12] .....	57
Abbildung 55: Darstellung der Referenzsubstanzen CKIA und CKIB.....	57
Abbildung 56: Analytisches HPLC-UV-Chromatogramm der Verbindung CKIA.....	58
Abbildung 57: Darstellung der Markierungsvorstufen 25 und 26.....	59
Abbildung 58: <sup>1</sup> H-NMR-Signal der Trimethylstannylgruppe von CKIB.....	60
Abbildung 59: <sup>1</sup> H-NMR-Signale des Pyridinrings der Verbindung CKIB.....	60
Abbildung 60: Darstellung der Referenzsubstanzen CKIC und CKID .....	61
Abbildung 61: Analytisches HPLC-UV-Chromatogramm der Verbindung CKIC.....	62
Abbildung 62: Darstellung der Markierungsvorstufe 24 für die Fluorethylierung. ....	63
Abbildung 63: Darstellung der Referenzsubstanz CKIE.....	63
Abbildung 64: Aufnahmen (Mikroskop) der verwendeten Zelllinien.....	65
Abbildung 65: Zweistufige Darstellung von [ <sup>124</sup> I]CKIA aus der Markierungsvorstufe 2571 .....	71
Abbildung 66: Auswertung einer Radio-DC. ....	73
Abbildung 67: Analytisches HPLC-Radiochromatogramm des [ <sup>124</sup> I]CKIA .....	78
Abbildung 68: Analytisches Radio-HPLC-Chromatogramm von [ <sup>124</sup> I]CKIB .....	79
Abbildung 69: Einführung des Fluorids in einer Ein-Schritt-Synthese (a) bzw. über die Darstellung einer prosthetischen Gruppe als Zwischenschritt (b) .....	80
Abbildung 70: Umsetzung der Modellverbindung 31 mit Ethylen-p-ditosylat führt zu doppelt substituierten Produkt 32 [171] .....	80
Abbildung 71: Darstellung des Tosylats über eine Zwei-Schritt-Synthese [171].....	81
Abbildung 72: Darstellung von [ <sup>18</sup> F]FETos.....	82
Abbildung 73: Allgemeine schematische Darstellung des Fließschemas des Programms TRACERlab Fx <sub>FN</sub> . ....	83
Abbildung 74: Darstellung von [ <sup>18</sup> F]BFE aus 1,2-Dibromethan .....	85
Abbildung 75: Darstellung der Tosylmarkierungsvorstufe 1-Brom-2-toluensulfonylethan .....	87
Abbildung 76: Darstellung des [ <sup>18</sup> F]BFE aus den beiden Markierungsvorstufen .....	87
Abbildung 77: HPLC Chromatogramme des Festphasen-gereinigten [ <sup>18</sup> F]BFES aus dem Nosylat .....	89
Abbildung 78: HPLC Chromatogramme des festphasengereinigten [ <sup>18</sup> F]BFES aus dem Tosylat 35 .....	90
Abbildung 79: Darstellung von [ <sup>18</sup> F]CKIE .....	91
Abbildung 80: Analytisches Radio-HPLC-Chromatogramm des [ <sup>18</sup> F]BFE nach 10 min (oben: MeCN, 130 °C, NaI, NaH; unten: MeCN/DMF (1:1), 130 °C, NaI, NaOH.....	92
Abbildung 81: Analytisches Radio-HPLC-Chromatogramm der Verbindung [ <sup>18</sup> F]CKIE nach der Reinigung .....	95
Abbildung 82: Analytisches Radio-HPLC-Chromatogramm des Reaktionsansatzes bei der Darstellung von [ <sup>18</sup> F]CKIE nach den Bedingungen von Veach <i>et al.</i> .....	96
Abbildung 83: Strukturen der drei radioaktiv markierten Inhibitoren [ <sup>124</sup> I]CKIA/B und [ <sup>18</sup> F]CKIE.....	99

Abbildung 84: Analytische HPLC-Radiochromatogramme der Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE in Ethanol, RPMI und PBS nach 1 h bei 37 °C .....	105
Abbildung 85: Zelluläre Radiotraceraufnahme von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB bei 37 °C [%ID/mg Protein] .....	106
Abbildung 86: Analytische HPLC-Radiochromatogramme von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA nach 60 min Inkubation in den Zelllinien HT-29 und FaDu.....	107
Abbildung 87: Zelluläre Radiotraceraufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE bei 37 °C [%ID/mg Protein] .....	107
Abbildung 88: Metabolische <i>in vivo</i> -Stabilität der Verbindungen [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB im Plasma der Ratten.....	110
Abbildung 89: HPLC-Radiochromatogramme von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE nach der Inkubation im Blut ür 2 und 30 min, sowie der Ausgangssubstanz (0 min).....	110
Abbildung 90: Bioverteilung von [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA und [ $^{124}\text{I}$ ]CKIB in ausgewählten Geweben und Organen von normalen männlichen Wistar-Ratten. ....	112
Abbildung 91: Dargestellte Referenzsubstanzen und Markierungsvorstufen Definitionen der Reste R, R' und X in Tabelle 23.....	116
Abbildung 92: Strukturen der drei radioaktiv markierten Inhibitoren [ $^{124}\text{I}$ ]CKIA/B und [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE.....	118
Abbildung 93: Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]CKIE über eine Zwei-Schritt/ Zwei-Topf-Synthese. ....	118
Abbildung 94: Strukturformel der Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]CKIF .....	121

## D Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: IC <sub>50</sub> -Werte der Flavopiridol-Derivate [46].	9
Tabelle 2: IC <sub>50</sub> -Werte der Inhibitoren [8]	15
Tabelle 3: IC <sub>50</sub> -Werte für beide Verbindungen [9, 10]	16
Tabelle 4: IC <sub>50</sub> -Werte von Derivaten der Pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidine [13]	17
Tabelle 5: Wichtige PET-Radionuklide	19
Tabelle 6: Elektroneneinfang und $\beta^+$ -Unwandlung	19
Tabelle 7: Kernreaktion für die Iod-124 Produktion [92]	22
Tabelle 8: Optimierung der Stillekupplung	45
Tabelle 9: Bezeichnung der einzelnen Verbindungen	55
Tabelle 10: Anteil der Zellen [%] in der G <sub>1</sub> -oder G <sub>0</sub> -Phase 24 h nach Behandlung mit verschiedenen Konzentration der Inhibitoren (n = 8)	65
Tabelle 11: Retentionszeiten der radiomarkierten Verbindungen	70
Tabelle 12: Optimierung der Radioiodierung bei Raumtemperatur	72
Tabelle 13: Untersuchung zur Entschützung von [ <sup>124</sup> I]29 mit TFA	75
Tabelle 14: optimale Bedingungen zur Darstellung von [ <sup>124</sup> I]CKIA bei geringen Aktivitätsniveau	75
Tabelle 15: optimale Bedingungen zur Darstellung von [ <sup>124</sup> I]CKIA für weiterführende Experimente	78
Tabelle 16: Versuche zur Darstellung von [ <sup>18</sup> F]FETos ausgehend von getrocknetem [ <sup>18</sup> F]Fluorid in 1 ml Acetonitril. (MV: Markierungsvorstufe, RG: Reaktionsgemisch, NP: Nebenprodukte)	82
Tabelle 17: Darstellung von [ <sup>18</sup> F]BFE in 1 ml MeCN, ausgehend von getrocknetem Fluorid (MV: Markierungsvorstufe, RG: Reaktionsgemisch, NP: Nebenprodukte)	86
Tabelle 18: Optimierung der Umsetzung von 28 mit [ <sup>18</sup> F]Fluorid in 1 ml Acetonitril (MV: Markierungsvorstufe)	88
Tabelle 19: Optimierungsversuche mit maximaler Ausbeute	93
Tabelle 20: Zusammenfassung der Radiomarkierung (MV: Markierungsvorstufe)	99
Tabelle 21: Berechnete logP und experimentell bestimmte logD <sub>7,4</sub> -Werte der dargestellten Referenzsubstanzen	103
Tabelle 22: Bestimmung des Anteils der Verbindung ([ <sup>124</sup> I]CKIA/[ <sup>124</sup> I]CKIB/[ <sup>18</sup> F]CKIE) nach Inkubation in den angegebenen Medien bei 37 °C	104
Tabelle 23: Bezeichnung der einzelnen Verbindungen und deren Gesamtausbeute	117
Tabelle 24: optimale Bedingungen der Radioiodierung	118
Tabelle 25: Markierungsbedingungen für die Darstellung von [ <sup>18</sup> F]BFE und [ <sup>18</sup> F]CKIE	119
Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der Radiomarkierung	119
Tabelle 27: Optimierung zur Darstillung von [ <sup>18</sup> F]CKIE. Der Anteil an Edukt spiegelt freies [ <sup>18</sup> F]BFE und [ <sup>18</sup> F]IFE wider	179

### Danksagung

Herrn Professor Jörg Steinbach und Herrn Professor Frank Wüst danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Herrn Dr. Jens Pietzsch, Dr. Ralf Bergmann, Frau Franziska Graf und Frau Andrea Suhr danke ich für die Durchführung der *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen und Frau Heidemarie Kasper und Herrn Waldemar Herzog für die Unterstützung bei den chemischen Synthesen.

Herrn Dr. Reik Löser und Herrn Dr. Constantin Mamat danke ich für die Unterstützung bei synthesechemischen Fragestellungen und bei der Auswertung der NMR-Spektren.

Herrn Stefan Preusche und der Zyklotronmanschaft danke ich für die Produktion und Bereitstellung des [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorids. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Herrn Tilow Krauß, der mir mit seinen Geschichten, die das Leben schrieb, oft die Wartezeit verkürzte.

Herrn Professor Gerd Wunderlich (Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden) möchte ich für die Lehrstunden zur Radioiodierung in der Klinik für Nuklearmedizin danken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Philipp Große-Gehling, der durch die Bearbeitung seines Diplomthemas zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Meiner Mit-Doktorandin Frau Theres Ramenda danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Bewältigung des Laboralltags, für die Durchführung der MALDI/TOF-MS-Analysen, für unermüdliches Korrekturlesen des Manuskripts und die Motivation und Freundschaft in schönen aber auch schwierigen Zeiten. Bei Frau Cindy Fischer möchte ich mich ebenfalls für das Korrekturlesen bedanken und natürlich für die vielen Gespräche, die immer wieder Sonnenschein in die Arbeit brachten.

Auch bei meinen Mit-Doktoranden, besonders bei Uta, Hassan, Franziska, Susan H., Björn, Tobias, Stefanie und Christin möchte ich mich für die chemischen und nicht-chemischen Diskussionen im (Arbeits-)Alltag und auf Tagungen bedanken. Allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes für Radiopharmazie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

*Schließlich* möchte ich die Menschen erwähnen, ohne die dieser Schritt nicht möglich gewesen wäre: meine Eltern, meine Schwester und besonders meinen Mann Christian. Ihr habt mich motiviert, gestärkt, zum Ende hin ertragen und jederzeit unterstützt. Danke.



## Publikationen

F. Graf, B. Mosch, L. Koehler, R. Bergmann, F. Wuest, J. Pietsch: cyclin-dependent kinase 4/6 (Cdk4/6) inhibitors: perspectives in cancer therapy and diagnostics. **2010**, eingereicht

L. Koehler, F. Graf, R. Bergmann, J. Steinbach, J. Pietzsch, F. Wuest: Radiosynthesis and radiopharmacological evaluation of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) inhibitors. *Eur J Nuc Med* **2010**, 45, 727-737

F. Graf, L. Koehler, T. Kniess, F. Wuest, B. Mosch, J. Pietzsch: Cell cycle regulating kinase Cdk4 as a potential target for tumor cell treatment and tumor imaging. *J Oncol* **2009**, ID 106378, doi:10.1155/2009/106378

F. Wuest, L. Koehler, M. Berndt, J. Pietzsch: Systematic comparison of two novel, thiol-reactive prosthetic groups for  $^{18}\text{F}$  labeling of peptides and proteins with the acylation agent succinimidyl-4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzoate ( $^{18}\text{F}$ SFB). *Amino Acids* **2009**, 36, 283-295

## Vorträge

F. Graf, L. Koehler, B. Mosch, J. Pietzsch: New fluorine-18 radiolabeled Cdk4/6 inhibitors: potential radiotracers for tumor imaging by positron emission tomography, 15<sup>th</sup> Congress of the European Cancer Organisation (ECCO) /34<sup>th</sup> Congress of the European Society for Medical Oncology (ESMO) **2009**, Berlin (Deutschland)

L. Koehler, F. Graf, J. Pietzsch, J. Steinbach, F. Wuest: Synthesis and radioiodination of two Cdk4 inhibitors. 16. Arbeitstreffen der AG Radiochemie/Radiopharmazie **2008**, Münster (Deutschland)

F. Graf, L. Koehler, F. Wuest, B. Mosch, J. Pietzsch: Biological, biochemical and radiopharmacological properties of two Cdk4 inhibitors. 16. Arbeitstreffen der AG Radiochemie/Radiopharmazie **2008**, Münster (Deutschland)

L. Vogler, M. Berndt, J. Pietzsch, F. Wuest:  $^{18}\text{F}$ FBAM and  $^{18}\text{F}$ FBOM: Novel thiol-reactive prosthetic groups derived from 4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzaldehyde. 14<sup>th</sup> Workshop: The

Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds, International Isotope Society Central European Division, Bad Soden (Deutschland) *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2007**, 50, 1276-1286

L. Vogler, M. Berndt, J. Pietzsch, Ch. Hultsch, F. Wuest: 4-[<sup>18</sup>F]Fluorobenzaldehyde-O-(2-{2-[2-(pyrrol-2,5-dione-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethyl)oxime ([<sup>18</sup>F]FBOM): A novel prosthetic group for mild labelling of SH-group carrying biomacromolecules. 14. Arbeitstreffen der AG Radiochemie/Radiopharmazie **2006**, Marburg (Deutschland), PS R06

## Poster

F. Graf, L. Koehler, B. Mosch, J. Pietzsch: Radiolabeled Cdk4/6 inhibitors for molecular imaging of tumors by positron emission tomography, 5<sup>th</sup> International Conference on Tumor microenvironment (ICMS) **2009**, Versailles (Frankreich)

L. Koehler, F. Graf, R. Bergmann, J. Steinbach, J. Pietzsch, F. Wuest: Imaging of the cell cycle: Synthesis and radiopharmacological evaluation of <sup>124</sup>I-labeled Cdk4 inhibitors. 18<sup>th</sup> International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS) **2009**, Edmonton (Kanada), P306

F. Treite, L. Köhler, B. Mosch, J. Pietzsch: Cell cycle regulating kinase Cdk4 as a potential target for tumour visualisation in vivo. 21st Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine **2008**, München (Deutschland), P447

L. Vogler, M. Berndt, J. Pietzsch, F. Wüst: [<sup>18</sup>F]FBAM and [<sup>18</sup>F]FBOM: Novel prosthetic groups for the mild labeling of thiol group containing biomacromolecules. 17<sup>th</sup> International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS), Aachen (Deutschland), *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2007**, 50, Suppl. 1, S117

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkenne die Prüfungsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der Fassung vom 16.04.2003 gemäß der Änderungssatzung vom 17.07.2008 an. Bisherige erfolglose Promotionsvorhaben haben nicht stattgefunden.

Dresden, den 10.06.2010

## **Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 10.06.2010